Über Synthese und optische Eigenschaften linearer Peptide aus Glycin und L-Tyrosin

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Hans-Joachim Neubauer

aus Quedlinburg

1965

Druck:

ERNST-REUTER-GESELLSCHAFT
der Förderer und Freunde der Freien Universität Berlin e.V.

DISSERTATIONS-DRUCKSTELLE

1 Berlin 33, Garystr. 45

Über Synthese und optische Eigenschaften linearer Peptide aus Glycin und L-Tyrosin

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Hans-Joachim Neubauer

aus Quedlinburg

Gutachter: Prof. Dr. W. Broser

Prof. Dr. G. Manecke

UNIVERSITEITSBIBLIOTHEEK - LEIDEN -

Tag der mündlichen Prüfung: 23. Juli 1965

Tag der Promotion: 24. NOV. 1965

Inhaltsübersicht

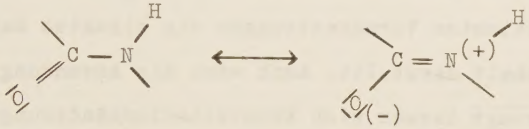
		Seite
I.	Einleitung	3
II.	Problemstellung	6
III.	Synthesewege	
	A. Ueberblick	8
	B. Durchführung	13
IV.	Rotationsdispersionen	17
V.	Diskussion	34
VI.	Experimenteller Teil	36
	A. Präparative Vorschriften	37
	B. Tabellenanhang	57
VII.	Zusammenfassung	62
VIII.	Literaturverzeichnis	63

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546516_0063

I. Einleitung

Die räumliche Ordnung natürlicher und synthetischer Polypeptide beruht nach Pauling und Corey (1) auf bestimmten Prinzipien: Die trans-Anordnung der durch Mesomerie stabilisierten ebenen Lage der Säureamidgruppe wird begünstigt.



Es wird eine maximale Anzahl Wasserstoffbrücken ausgebildet. Von allen unter diesen Voraussetzungen denkbaren Anordnungen der Polypeptidkette ist die energetisch günstigste die α-Helix. Hierbei ist die Kette zu einer Spirale gewunden, in der auf jede Windung etwa 3,7 Aminosäureeinheiten entfallen. Es konnte röntgenographisch nachgewiesen werden (2), daß viele kristallisierte Polypeptide in dieser Struktur vorliegen.

Auch gelöste Polypeptide vermögen derartige Strukturen auszubilden.

Zur experimentellen Ermittlung der Peptidstruktur in Lösung hat sich neben anderen Methoden vor allem die Rotationsdispersion als wertvolles Hilfsmittel erwiesen. Viele lineare Polypeptide zeigen beim Uebergang von einem Wasserstoffbrücken stabilisierenden zu einem Wasserstoffbrücken lösenden Lösungsmittel und bei Änderung des pH-Werts oder der Temperatur charakteristische Drehungsänderungen, die als Um-

wandlung der Helixstruktur in eine ungeordnete Form gedeutet werden konnten. Diese Annahme wurde durch die Messung anderer Eigenschaften (Strömungsdoppelbrechung, Viskosität (3)) bestätigt. Zur phänomenologischen Behandlung der Rotationsdispersion wurden verschiedene Gleichungen vorgeschlagen (20,21), von denen die von Moffit am häufigsten angewendet wird. Sie enthält einen Parameter b_o (vgl. S. 18), der unter bestimmten Voraussetzungen ein direktes Maß für den α-Helixgehalt darstellt. Auch wenn die Anwendung dieser Gleichung versagt lassen sich Konstellationsänderungen mit Hilfe der Rotationsdispersion erkennen.

Die Bedeutung der Polypeptidstruktur erwies sich auch für die Arbeiten von Lautsch und Mitarbeitern über synthetische Fermentmodelle aus prosthetischer Gruppe und Polypeptidträger (4) als wesentlich. Im Rahmen dieser Arbeiten wurden auch die Eigenschaften einer Reihe heterodeter und homodeter cyclischer Oligopeptide, die als Modellsubstanzen für aktive Bereiche der Polypeptidkette gedacht waren, untersucht (5-14).

Die Rotationsdispersionen der homodeten Cyclohexapeptide zeigten eine charakteristische Abhängigkeit sowohl von der Sequenz der Peptidkette als auch vom Lösungsmittel. Das symmetrisch gebaute cyclo-(L-Phe-gly-gly-L-phe-gly-gly) gab in Dimethylformamid eine normale Rotationsdispersion mit negativen Vorzeichen, hingegen in Dichloressigsäure eine sehr geringe Wellenlängenabhängigkeit der Drehung und sehr kleine Absolutwerte. Die Rotationsdispersion des unsymmetrischen

cyclo-(L-Phe-gly-L-phe-gly-gly-gly-) unterscheidet sich hiervon durch die wesentlich größeren Absolutwerte in Dichloressigsäure, die aber auch die gleiche geringe Wellenlängenabhängigkeit zeigen (5,10). Analog aufgebaute Cyclohexapeptide mit anderen optisch aktiven Aminosäuren verhielten sich ähnlich (6,7).

II. Problemstellung

Um mögliche Strukturbeziehungen der oben genannten Cyclopeptide zu entsprechenden Bereichen der Polypeptidkette weiterzuverfolgen, war es wünschenswert, definierte lineare Oligopeptide herzustellen und ihre Rotationsdispersionen zu untersuchen. Ferner erschien es bei Beginn der vorliegenden Arbeit interessant, die entsprechenden Cyclopeptide herzustellen und ihre Rotationsdispersionen mit denen der linearen Peptide zu vergleichen. Dabei mußte eine Kettenlänge gewählt werden, die mit derjenigen der bekannten Cyclopeptide vergleichbar ist und zugleich die Ausbildung helixartiger Strukturelemente ermöglicht, so daß ein Vergleich mit der Polypeptidkette möglich ist. Eine Verknüpfung von acht Aminosäureeinheiten erschien günstig, weil damit eine Ausbildung von ungefähr zwei α-Helixwindungen und wenigstens einer Wasserstoffbrücke an jeder Peptidbindung möglich würde. Diese Kettenlänge entspricht auch der Gliederzahl einiger größerer in diesem Zusammenhang hergestellter Cyclopeptide (9). Ferner wäre ein Versuch möglich, durch Konstellation bedingte Drehungsbeiträge der Octapeptide durch Vergleich ihrer Rotationsdispersionen mit denen von Tetrapeptiden zu erkennen, aus denen die Octapeptide aufgebaut sind. Hierzu wäre allerdings eine möglichst kleine Anzahl von Asymmetriezentren in übersichtlicher Stellung erforderlich.

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Herstellung linearer Octapeptide, die sechs Glycinreste und als optisch aktive

Bestandteile jeweils zwei L-Tyrosinreste enthalten. Die Stellung der Tyrosinreste in der Kette sollte variiert werden. Die Tetrapeptidhälften der linearen Octapeptide sollten auch in ungeschützter Form hergestellt werden. Die Rotationsdispersionen aller Verbindungen sollten untersucht werden. Als Ergänzung erschien die Herstellung der entsprechenden cyclischen Octapeptide wünschenswert.

III. Synthesewege

A. Ueberblick

Die für die Darstellung der Tetra- und Octapeptide beschrittenen Synthesewege sind aus den unten angegebenen Schemata ersichtlich (Abb. 1-3). Es wurde nach bekannten Peptidsynthesemethoden, der Azid- (15) und Cyanmethylestermethode (16) gearbeitet. Bei beiden Verfahren wurden in Uebereinstimmung mit den Literaturangaben keine Racemisierungserscheinungen beobachtet.

Zum Schutz der Aminogruppe wurde in allen Fällen der Carbobenzoxyrest (17) verwendet. Seine Abspaltung erfolgte bei den Zwischenprodukten mit Bromwasserstoff in Eisessig (18) und bei den Endprodukten durch Hydrieren mit Wasserstoff in Gegenwart von Palladiumoxid auf Bariumsulfat als Katalysator (35).

Ein Schutz der Hydroxylgruppe des L-Tyrosins war während der Synthese nicht erforderlich.

Die Octapeptide wurden stets durch Umsetzen von N-Carbobenzoxytetrapeptid-cyanmethylester mit Tetrapeptidester-Hydrobromid in Gegenwart von Triäthylamin erhalten. Dieser Weg erschien am zweckmäßigsten, weil sich beide Teilstücke noch durch gute Kristallisation reinigen ließen. Die so erhaltenen geschützten Octapeptidester wurden mit Natronlauge in Methanol zur entsprechenden Carbonsäure verseift und dann

durch Hydrieren in das freie Octapeptid übergeführt.

Zur Herstellung der Tetrapeptide wurde nach Möglichkeit von bekannten Vorstufen ausgegangen. Aus N-Carbobenzoxy-triglycin (33) wurde der Cyanmethylester gemacht und dieser mit L-Tyrosinmethylester zum geschützten Tetrapeptidester der Sequenz (I) gekuppelt. Aus N-Carbobenzoxy-glycyl-L--tyrosinazid (36) und Glycylglycinäthylester (39) wurde das entsprechende Tetrapeptid der Sequenz (II) und aus N-Carbobenzoxy-diglycyl-L-tyrosinazid (38) und Glycinäthylester das Tetrapeptid der Sequenz (III) erhalten. Aus den N-Carbobenzoxy-tetrapeptidestern wurden durch Behandeln mit Bromwasserstoff in Eisessig die Tetrapeptidester-Hydrobromide und durch Verseifen mit Natronlauge/Methanol die N-Carbobenzoxy-tetrapeptide erhalten. Aus diesen wurden die Cyanmethylester mit Chloracetonitril und Triäthylamin hergestellt. Die ungeschützten Tetrapeptide I, II und III wurden aus den entsprechenden Carbobenzoxyverbindungen durch Hydrieren gewonnen. Die Verbindungen I und II sind auf anderem Wege schon früher hergestellt worden (34, 37). In den folgenden Reaktionsschemata und den weiteren Ausführungen wurde die Konfigurationsbezeichnung 'L' vor Tyrosin meistens fortgelassen, weil es sich in jedem Falle um optisch aktives L-Tyrosin handelt.

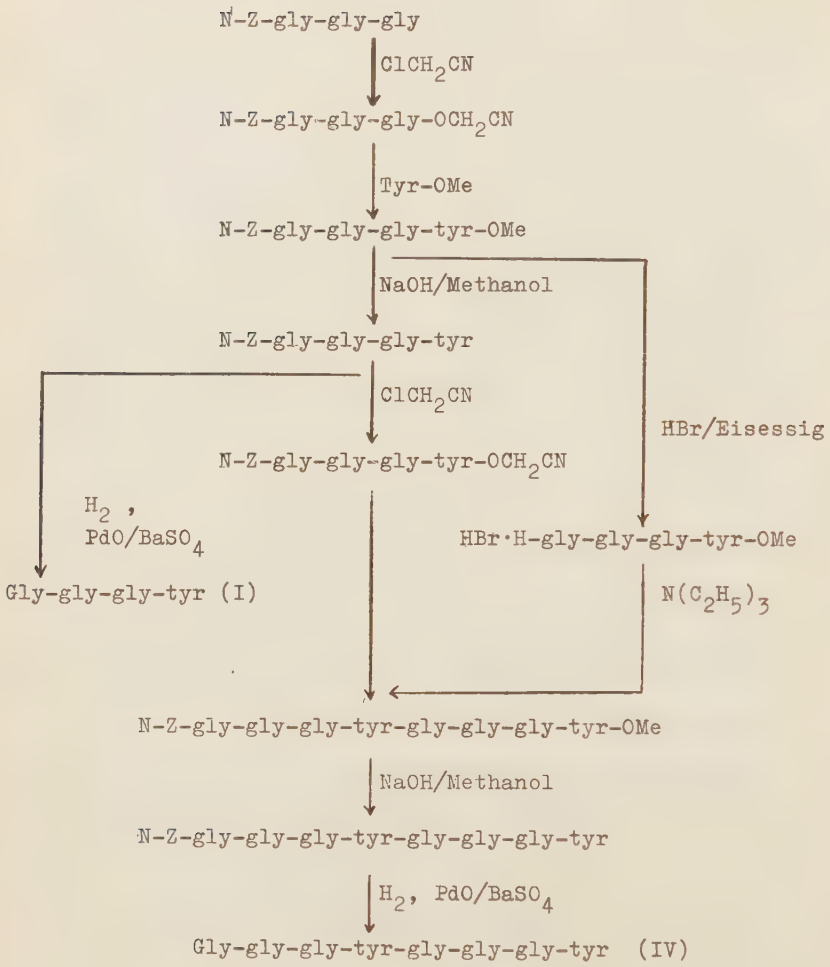

N-Z-gly-gly-gly
ClCH2CN
N-Z-gly-gly-gly-OCH2CN
Tyr-OMe
N-Z-gly-gly-gly-tyr-OMe
NaOH/Methanol
N-Z-gly-gly-gly-tyr
ClCH2CN
HBr/Eisessig
N-Z-gly-gly-gly-tyr-OCH2CN
H2 ,
PdO/BaSO4
HBr·H-gly-gly-gly-tyr-OMe
Gly-gly-gly-tyr (I)
N(C2H5)3
N-Z-gly-gly-gly-tyr-gly-gly-gly-tyr-OMe
NaOH/Methanol
N-Z-gly-gly-gly-tyr-gly-gly-gly-tyr
H2, PdO/BaSO4
Gly-gly-gly-tyr-gly-gly-gly-tyr (IV)

Abb. 1

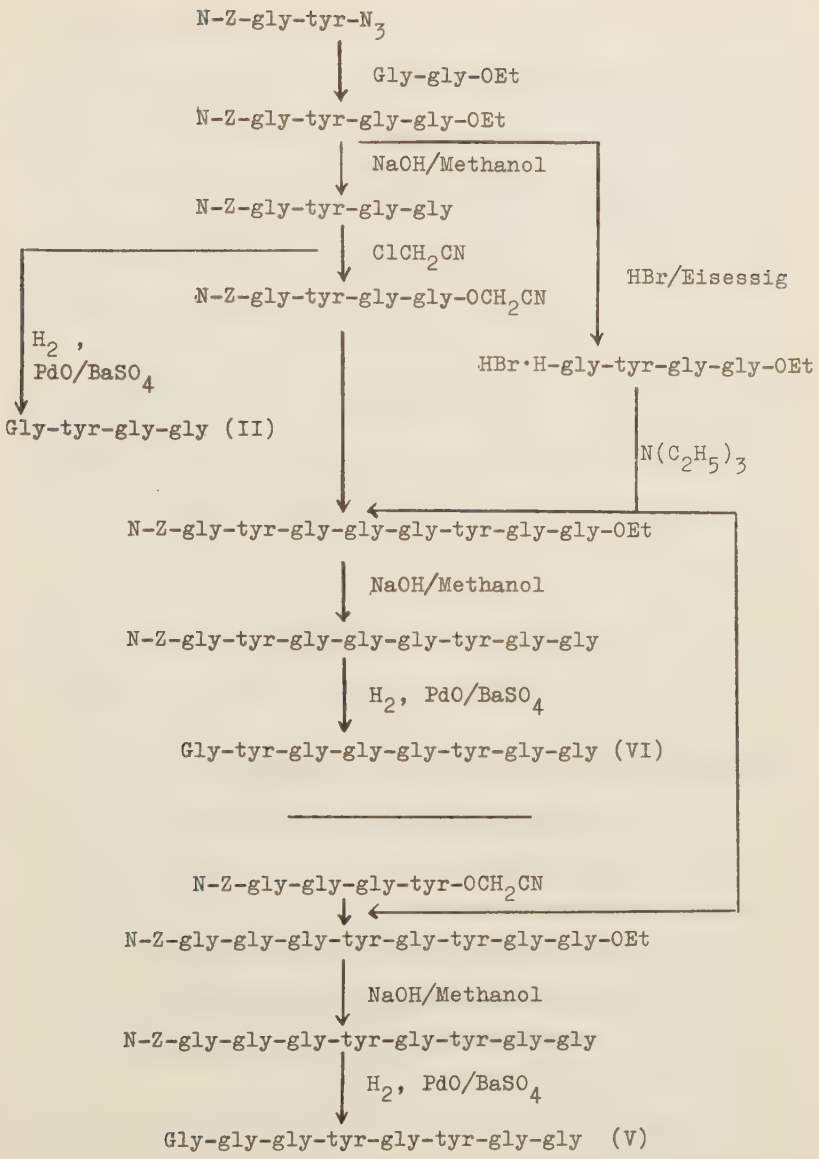

N-Z-gly-tyr-N3
Gly-gly-OEt
N-Z-gly-tyr-gly-gly-OEt
NaOH/Methanol
N-Z-gly-tyr-gly-gly
ClCH2CN
HBr/Eisessig
N-Z-gly-tyr-gly-gly-OCH2CN
H2 , PdO/BaSO4
HBr·H-gly-tyr-gly-gly-OEt
Gly-tyr-gly-gly (II)
N(C2H5)3
N-Z-gly-tyr-gly-gly-gly-tyr-gly-gly-OEt
NaOH/Methanol
N-Z-gly-tyr-gly-gly-gly-tyr-gly-gly
H2, PdO/BaSO4
Gly-tyr-gly-gly-gly-tyr-gly-gly (VI)
N-Z-gly-gly-gly-tyr-OCH2CN
N-Z-gly-gly-gly-tyr-gly-tyr-gly-gly-OEt
NaOH/Methanol
N-Z-gly-gly-gly-tyr-gly-tyr-gly-gly
H2, PdO/BaSO4
Gly-gly-gly-tyr-gly-tyr-gly-gly (V)

Abb. 2

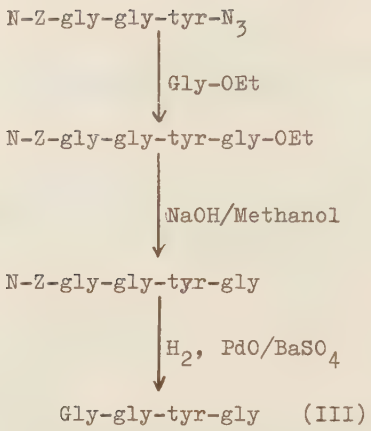


Abb. 3

Zusammenstellung der verwendeten Abkürzungen:

(I) Gly-gly-gly-L-tyr

(II) Gly-L-tyr-gly-gly

(III) Gly-gly-L-tyr-gly

(IV) Gly-gly-gly-L-tyr-gly-gly-gly-L-tyr

(V) Gly-gly-gly-L-tyr-gly-L-tyr-gly-gly

(VI) Gly-L-tyr-gly-gly-gly-L-tyr-gly-gly

B. Durchführung

Die N-geschützten Tetrapeptidester und die durch Verseifen daraus erhaltenen Carbonsäuren sind gut kristallisierende Verbindungen, die sich verhältnismäßig leicht reinigen lassen. Sie kristallisieren mit Wasser oder Alkohol, geben aber bis auf eine Ausnahme (N-Carbobenzoxy-diglycyl-tyrosyl-glycin) das Lösungsmittel beim Trocknen ab.

Die Tetrapeptidester-Hydrobromide, die durch Abspaltung der N-Carbobenzoxygruppe mit Bromwasserstoff in Eisessig (18) erhalten worden waren, konnten nicht auf dem üblichen Wege isoliert werden. Bisher wurde das Reaktionsprodukt aus der Lösung mit absolutem Äther ausgefällt und durch Auflösen in absolutem Alkohol und Fällen mit absolutem Äther gereinigt. Bei den hier vorliegenden Peptiden konnten aber nach diesem Verfahren die Reaktionsprodukte nur als stark viskoses Oel bzw. als amorphes Pulver erhalten werden und durch Trocknen und Umfällen weder von dem anhaftenden Benzylbromid befreit noch zur Kristallisation gebracht werden. Hier wurde schließlich auf wasserfreies Arbeiten verzichtet und das Reaktionsprodukt in Wasser gelöst und mehrmals mit Essigester ausgeschüttelt. Aus der wäßrigen Lösung ließ sich durch Eindampfen und Verdünnen mit Äthanol das Triglycyl-tyrosin-methylester-Hydrobromid in großen Kristallen mit guter Ausbeute isolieren. Beim Glycyl-tyrosyl-glycyl-glycin-äthylester Hydrobromid mußte erst alles Wasser durch Azeotropdestillation mit Äthanol und Toluol aus der Lösung entfernt werden, ehe die Verbindung kristallisierte. Eine mögliche Racemi-

sierung oder Verseifung der Hydrobromide durch den großen Säureüberschuß konnte vermieden werden, wenn die Temperatur bei allen Operationen unter 30° gehalten wurde.

Die Isolierung und Reinigung der geschützten Octapeptidester und der entsprechenden Carbonsäuren bereitete Schwierigkeiten, da ihre Löslichkeit keine Kristallisation zuläßt. Durch die Anhäufung von Glycinresten im Molekül - insgesamt sechs und bis zu drei hintereinander - werden die Peptide in wasserfreien Lösungsmitteln, wie Alkoholen, Aceton, Essigester, praktisch unlöslich. Die hydrophobe Schutzgruppe bewirkt in Verbindung mit der Molekülgröße die Unlöslichkeit in Wasser und eine starke Quellung in Wasser/Alkohol- und Wasser/Aceton-Gemischen. In einigen Fällen ließ sich zwar die Quellung durch Zusatz von Essigester zurückdrängen, doch konnte aus den gelartigen Niederschlägen das Lösungsmittel (Wasser oder Alkohol) nicht immer durch Trocknen vollständig entfernt werden. Die Schmelzpunkte sind bei allen Octapeptiden nicht mehr charakteristisch. Als wichtigstes Reinheitskriterium bleibt hier das Papierchromatogramm, das ein empfindlicher Hinweis auf Nebenprodukte oder nicht umgesetzte Ausgangsprodukte ist.

Die ungeschützten Octapeptide sind wieder wasserlöslich. Sie kristallisieren aus Wasser, die Verbindung IV allerdings erst nach häufigem Umfällen aus Wasser/Methanol. Nach dem Trocknen bei 80° im Vakuum enthält V noch ein Mol Wasser, VI 2 Mol Wasser und IV 1 Mol Methanol.

Eine Cyclisierung der Octapeptide wurde über die p-Nitrophenylester in Angriff genommen, weil diese im Gegensatz zu den Cyanmethylestern nicht mit HBr/Eisessig reagieren sollten. Aus den N-Carbobenzoxy-octapeptid-carbonsäuren der Sequenz IV und V wurden mit Di-p-nitrophenylsulfit die aktivierten Ester hergestellt. Eine Reinigung dieser Verbindungen war nicht möglich, weil sie sich nur in wasserhaltigen Lösungsmittelgemischen lösten, die bei jedem Erwärmen eine partielle Verseifung des p-Nitrophenylesters hervorriefen, die leicht an der Gelbfärbung der alkalisch gemachten Mutterlauge zu erkennen war. Es mußte daher mit dem Rohprodukt weitergearbeitet werden. Die Carbobenzoxygruppe wurde mit HBr/Eisessig abgespalten, das Reaktionsprodukt mit Äther gefällt, gewaschen und getrocknet. Es wurde dann in Dimethylformamid gelöst und bei 50° bzw. 60° in Pyridin eingetropft, um es zu cyclisieren. Das Chromatogramm des Reaktionsproduktes zeigte durch Vergleich der Anfärbung mit Ninhydrin und diazotierter Sulfanilsäure nur lineare Peptidfraktionen an. Eine cyclische Komponente konnte aus dem Gemisch weder durch Umkristallisieren noch durch Chromatographie an Cellulosepulver isoliert werden.

Das Mißlingen dieser Versuche kann zum Teil durch die ungenügende Reinheit des aktivierten Esters erklärt werden. Der bereits unreine geschützte p-Nitrophenylester verliert bei der nachfolgenden Umsetzung mit HBr/Eisessig noch beträchtlich an Aktivität. Diese Annahme wird durch die Beobachtung gestützt, daß die ätherische Mutterlauge, die nach

dieser Reaktion anfällt, noch erhebliche Mengen p-Nitrophenol enthält. Diese partielle Verseifung konnte auch durch absolut wasserfreies Arbeiten nicht vermieden werden. Bei der Cyclisierung kann nun durch intermolekulare Reaktion eine Anzahl von oligomeren linearen Nebenprodukten gebildet werden, während mit 100 %igem aktiviertem Ester bei vollständiger Umsetzung nur cyclische oder hochpolymere Reaktionsprodukte entstehen können, die sich leichter voneinander trennen lassen.

Wahrscheinlich neigen lineare Octapeptide auf Grund ihrer Konstellation in Pyridin/Dimethylformamid weniger zur intramolekularen Reaktion als die Hexapeptide. Zu diesem Schluß führt auch die von Schwyzer (31) beobachtete Verdoppelungstendenz der Tripeptide, die bei Tetrapeptiden nicht auftritt. Die Frage der Konstellation der linearen Octapeptide in Lösung wird noch an anderer Stelle (S. 34) aufgegriffen werden.

IV. Rotationsdispersionen

Die Rotationsdispersion eines Stoffs ist die Abhängigkeit der Drehung der Ebene linear polarisierten Lichts von dessen Wellenlänge. Man unterscheidet normale und anomale Rotationsdispersionen. Bei normaler Rotationsdispersion steigt der Betrag der spezifischen Drehung mit abnehmender Wellenlänge stetig an. Sie tritt auf bei ausreichendem Abstand von Absorptionen im Elektronenspektrum des optisch aktiven Stoffs. Bei Annäherung an eine Absorptionsbande, die zum Asymmetriezentrum in Beziehung steht, geht sie in die anomale Rotationsdispersion über. Mit der Annäherung an das Absorptionsmaximum steigt der Drehungsbetrag immer steiler an, erreicht ein Maximum und schneidet nach steilem Abfall die Nullinie bei der Wellenlänge des Absorptionsmaximums. Die Kurve verläuft dann mit umgekehrtem Vorzeichen symmetrisch zu ihrem ersten Teil. Bei gleichzeitigem Einfluß mehrerer Absorptionsmaxima nimmt die anomale Rotationsdispersion einen unsymmetrischen Verlauf mit mehreren Extremwerten, die nicht mehr mit Vorzeichenwechseln verbunden zu sein brauchen (komplexe Rotationsdispersion).

Bei Peptiden und Eiweißkörpern, die stets erst im ultravioletten Bereich absorbieren, verläuft die Rotationsdispersion im sichtbaren Bereich weitgehend normal. Im nahen Ultraviolett kann sie anomal werden. Zur Beschreibung der Rotationsdispersion wurde von Drude (20) eine einfache Gleichung vorgeschlagen, die jedoch nur für einen normalen

Kurvenverlauf gilt:

$$[\alpha]_\lambda = \frac{K}{\lambda^2 - \lambda_o^2}$$

K und λ_o sind individuelle Konstanten, die vom Stoff, Lösungsmittel, der Temperatur usw. abhängen.

Eine erweiterte Gleichung wurde von Moffit (21) angegeben, die auch anomale Dispersionen zu beschreiben vermag:

$$[m'] = \frac{a_o \lambda_o^2}{\lambda^2 - \lambda_o^2} + \frac{b_o \lambda_o^4}{(\lambda^2 - \lambda_o^2)^2}$$

[m'] ist hier die modifizierte molare oder 'Restdrehung', die den Korrekturfaktor $\frac{3}{n_\lambda^2 + 2}$ für die Dispersion des Brechungsindex des Lösungsmittels enthält:

$$[m'] = \frac{3}{n^2 + 2} \cdot \frac{[\alpha] M}{100}$$

M ist das Molgewicht oder bei Polymeren das mittlere Formeleinheitsgewicht, n der Brechungsindex des Lösungsmittels.

Diese Gleichungen gelten streng nur für Wellenlängenbereiche, die einen ausreichenden Abstand von einem Absorptionsmaximum der optisch aktiven Substanz haben.

Wenn das zu untersuchende Peptid keine Eigenabsorption oberhalb etwa 200 nm hat, lassen sich mit Hilfe der Moffit'schen Gleichung Aussagen über seine Struktur machen.

Es gibt zwei Möglichkeiten der Anordnung von Aminosäureeinheiten in der α-Helixstruktur: die rechtsgewendelte und die linksgewendelte Helix. Jede Form bringt eine zusätzliche Asymmetrie in das Molekül und trägt damit zur optischen Drehung bei. Es konnte gezeigt werden, daß eine Aminosäure bestimmter Konfiguration in polymerisiertem Zustand stets den gleichen Schraubensinn bevorzugt. Die meisten natürlichen Aminosäuren, z.B. Glutaminsäure, L-Lysin, bilden rechtsgewendelte α-Helices (22-24). Poly-L-Asparaginsäure ist eines der wenigen Beispiele für eine linksgewendelte α-Helixstruktur (19). Es wurden Zahlenwerte für die 'Eigendrehung' der α-Helixstruktur ermittelt, die in guter Uebereinstimmung mit einem theoretisch abgeleiteten Wert standen (25).

In der Moffit'schen Gleichung ist die Konstante b_o im zweiten Summanden charakteristisch für diesen Drehungsbeitrag. Wenn die Aminosäuren, aus denen das Polypeptid aufgebaut ist, keine Absorption oberhalb etwa 200 nm haben, liegt der Wert von λ_o ungefähr bei 212 nm. In diesem Fall ist b_o weitgehend unabhängig von der Natur der Aminosäureeinheiten und vom Lösungsmittel. Es hat bei vielen helixförmigen Polypeptiden übereinstimmend einen Wert in der Nähe von -600 und bei Vorliegen der zufallsgeknäulten Form den Wert Null. Die Rotationsdispersion wird in diesem Fall normal und die Gleichung geht in die einfache Drude'sche Form über.

Wenn das Peptid aus aromatischen Aminosäuren, wie L-Phenyl-

alanin oder L-Tyrosin, aufgebaut ist, hat λ_o infolge der längerwelligen Eigenabsorption einen erheblich höheren Wert. Aus dem gleichen Grund kann b_o nie Null werden, denn schon die zufallsgeknäuelte Form liefert im nahen Ultraviolett eine anomale Rotationsdispersion.

Für die vorliegenden Peptide konnten also keine b_o-Werte erwartet werden, die mit denen anderer Peptide direkt vergleichbar sind. Dagegen war damit zu rechnen, daß für alle sechs Verbindungen mindestens im gleichen Lösungsmittel gleiche oder sehr nahe beieinanderliegende λ_o-Werte gelten würden. In diesem Fall wäre ein Vergleich der b_o-Werte untereinander zulässig und ein Rückschluß auf eventuelle Strukturunterschiede zwischen Tetra- und Octapeptiden möglich gewesen. Die Anwendung der Moffit'schen Gleichung auf die Rotationsdispersionen der vorliegenden Peptide ergab jedoch auch im gleichen Lösungsmittel erheblich voneinander abweichende λ_o-Werte (vgl. S.61). Auf eine Berechnung der b_o-Werte wurde daher verzichtet.

Die Auswertung der Rotationsdispersionskurven vorliegender Arbeit muß sich also hauptsächlich auf qualitative Aussagen beschränken.

Es sind zunächst die Rotationsdispersionen der Tetrapeptide mit denen der Octapeptide zu vergleichen. Es kann vorausgesetzt werden, daß Tetrapeptide, die im Pauling'schen Modell der α-Helix noch keine Wasserstoffbrücke auszubilden vermögen, keinen durch Konstellation bedingten Beitrag zur

optischen Drehung liefern. Octapeptide können bereits vier intramolekulare Wasserstoffbrücken bilden und damit in einer Helixstruktur stabilisiert werden. Diese Annahme wurde auch experimentell bestätigt (26).

Die folgenden Abbildungen 4 - 9 zeigen die Rotationsdispersionen der Verbindungen I bis VI in Wasser, Dimethylsulfoxid und Dichloressigsäure. Sie wurden bei den Wellenlängen 313, 364, 436, 546 und 578 nm gemessen.

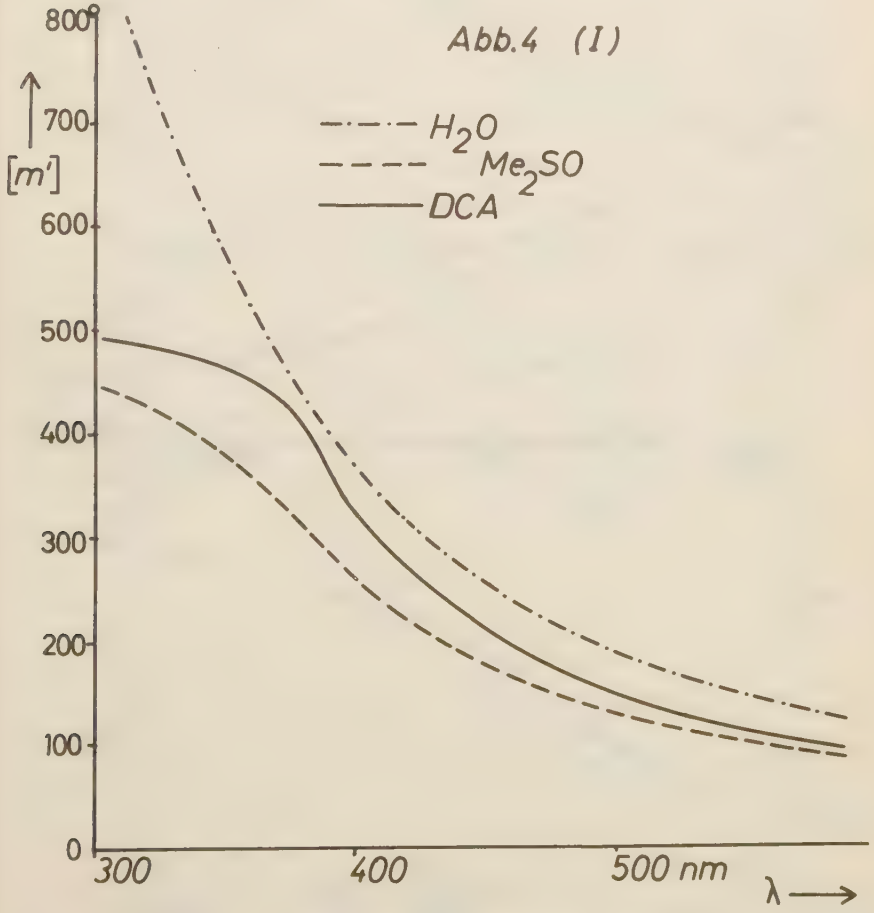
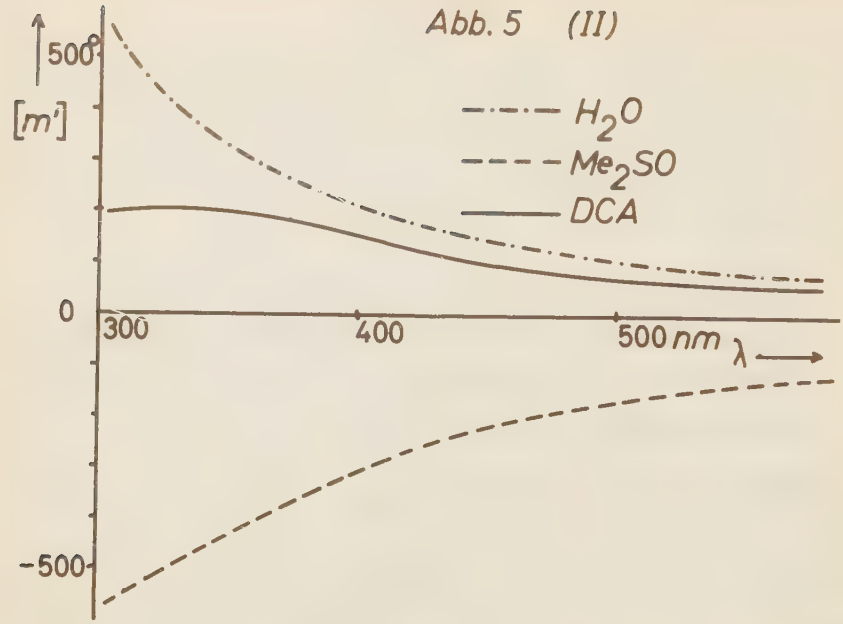


Abb. 5 (II)



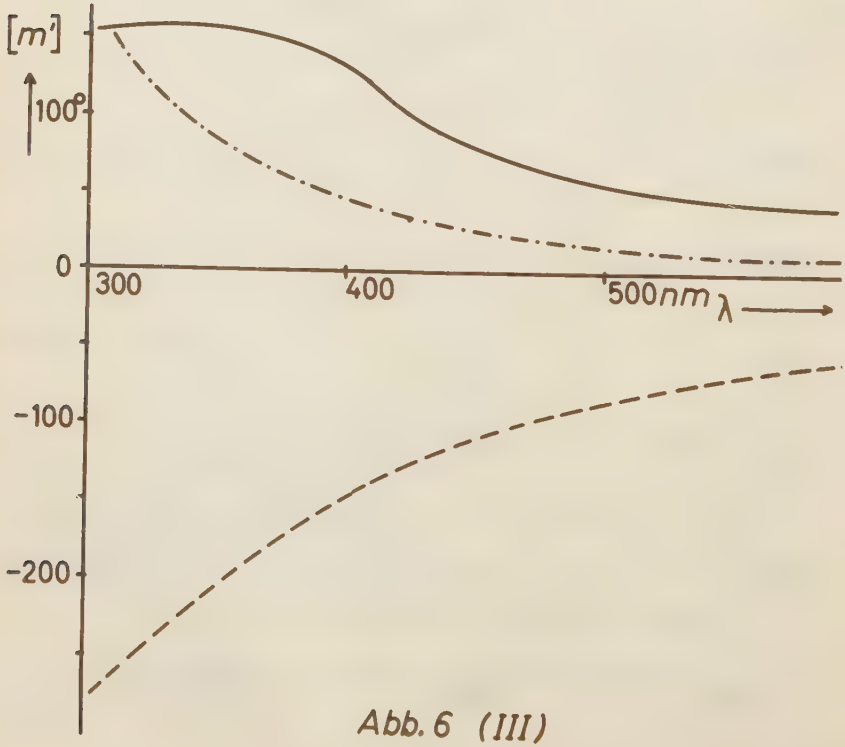


Abb. 6 (III)

Abb. 7 (IV)

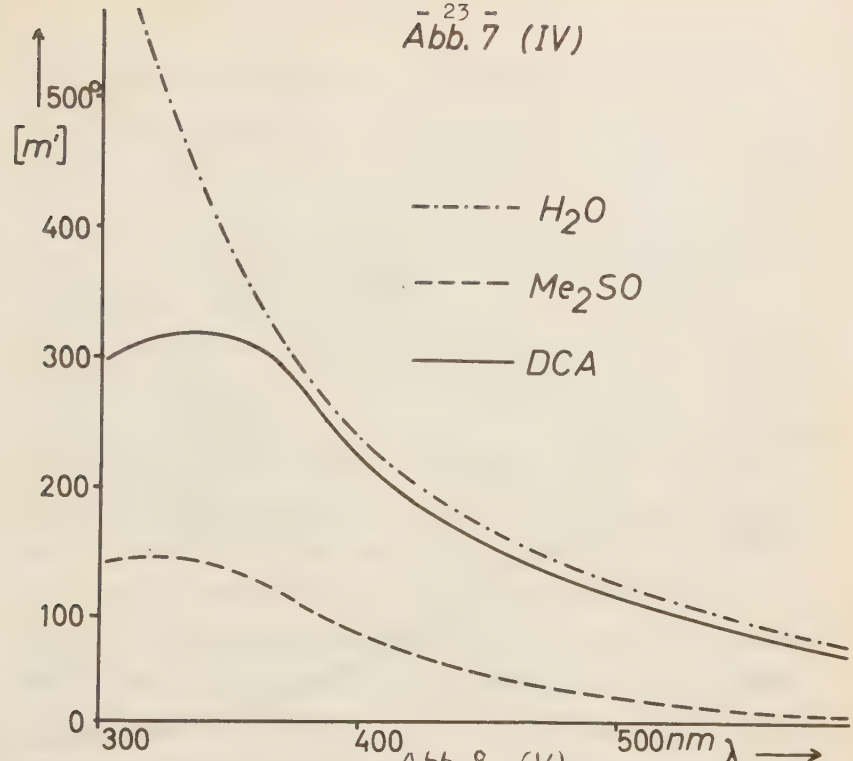
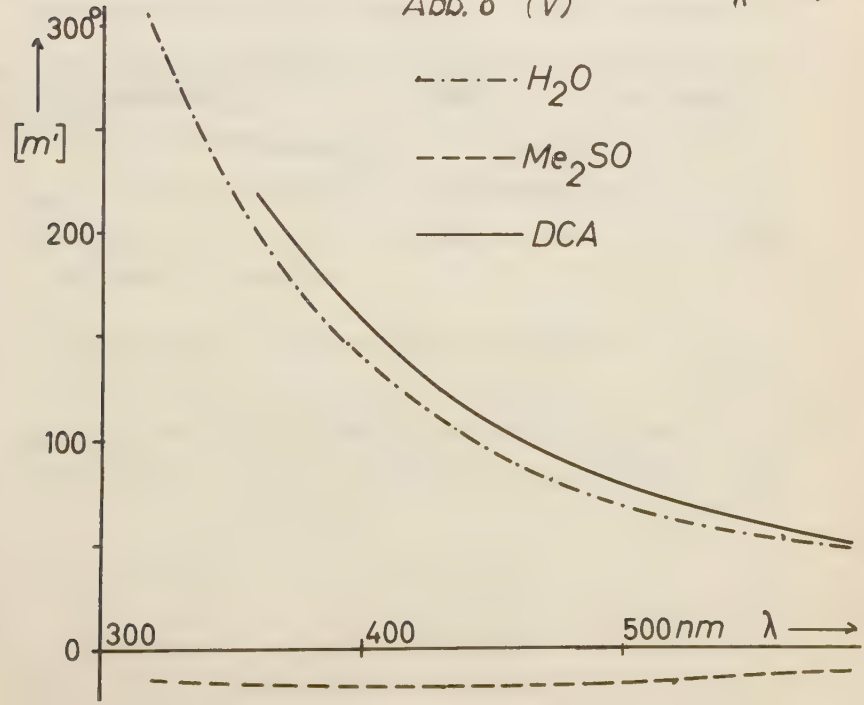


Abb. 8 (V)



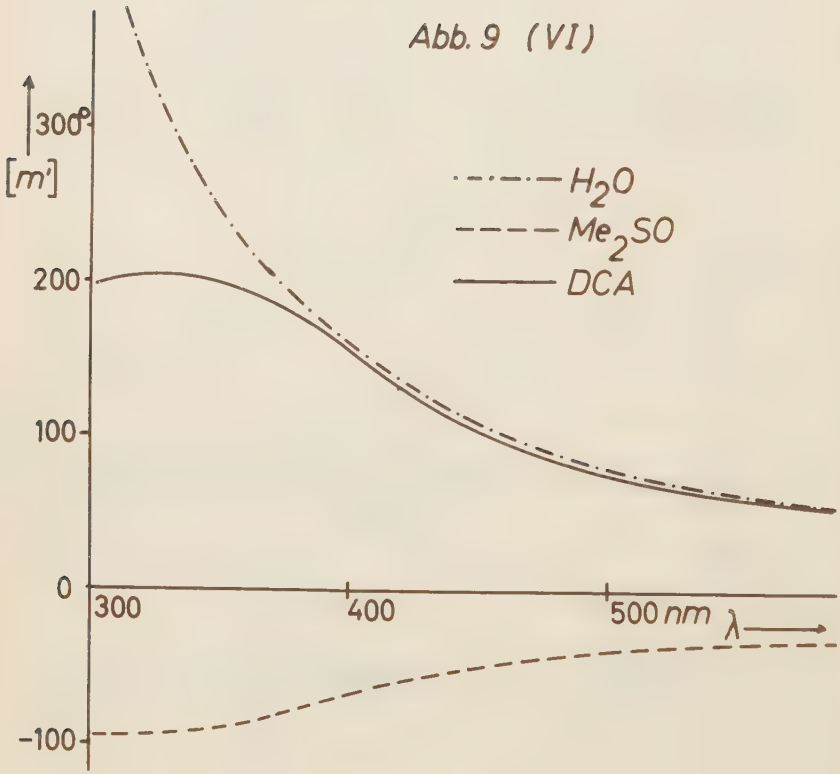


Abb. 9 (VI)
300°
[m']
200
100
0
-100
300
400
500 nm
λ
H2O
Me2SO
DCA

Für alle Verbindungen sind die Drehwerte in Dichloressigsäure stärker positiv als in Dimethylsulfoxid. Eine Sonderstellung nehmen die beiden Peptide mit endständigem Tyrosinrest ein (I und IV). Sie ergeben als einzige überhaupt positive Drehwerte in Dimethylsulfoxid, und die Differenz zwischen den Werten in Dimethylsulfoxid und in Dichloressigsäure ist bei ihnen relativ am kleinsten, hat aber das gleiche Vorzeichen wie bei den übrigen Peptiden.

Da diese groben Unterschiede bei Tetra- und Octapeptiden die gleiche Richtung haben, können sie nicht auf Änderungen der Peptidkonstellation (Helix/regellose Kette) zurückgeführt werden. Ihre Ursache muß in einem Einfluß des Lösungsmittels auf das Asymmetriezentrum selbst durch solvatochrome Verschiebung optisch aktiver Absorptionsbanden gesucht werden. Dieser Einfluß läßt sich spektrometrisch nicht nachweisen, weil beide Lösungsmittel, Dimethylsulfoxid und Dichloressigsäure, im Bereich der Tyrosinabsorptionsbanden UV-undurchlässig sind. In Dimethylsulfoxid läßt sich noch das Maximum der längstwelligen Tyrosinabsorption bei etwa λ_{max} = 280 nm bestimmen. Die entsprechende Absorption in Wasser liegt bei etwa 275 nm; hier ist also eine deutliche Verschiebung zu erkennen.

Es läßt sich nicht ohne weiteres entscheiden, ob die Rotationsdifferenz zwischen Dimethylsulfoxid und Dichloressigsäure bei den Octapeptiden einen 'Konstellationsanteil' enthält. Hierzu ist noch eine Betrachtung der entsprechenden

Tetrapeptide notwendig.

Das Octapeptid VI (Gly-tyr-gly-gly-gly-tyr-gly-gly) setzt sich formal aus zwei Einheiten der Sequenz des Tetrapeptids II (Gly-tyr-gly-gly) zusammen. Da die Verknüpfungsstelle um mindestens einen Glycinrest von jedem optisch aktiven Tyrosinrest entfernt ist, kann vorausgesetzt werden, daß der Substituenteneinfluß auf das Asymmetriezentrum nicht sehr groß ist. (Entfernungssatz, vgl. (27)). In grober Näherung könnte angenommen werden, daß sich die molare Rotation des Octapeptids bei ungeordneter Lage additiv aus den Rotationsbeiträgen der beiden Asymmetriezentren zusammensetzt, daß sie also etwa das Doppelte derjenigen des Tetrapeptids II beträgt. Daß diese Annahme berechtigt ist, zeigt ein Vergleich der Rotationsdispersionen von VI und II in Dichloressigsäure (Abb. 9 und 5). Da die [m']-Werte für die Octapeptide bereits auf das halbe Molgewicht, also die der "Tetrapeptideinheit" entsprechende Drehung bezogen sind, ergibt sich unmittelbar eine weitgehende Uebereinstimmung der Zahlenwerte. Ähnlich kann man sich die Drehungen von IV und V in Dichloressigsäure aus denen von III + I bzw.III + II zusammengesetzt denken:

IV	Gly-gly-gly-tyr-gly-gly-gly-tyr
III	Gly-gly-tyr-gly +
I	Gly-gly-gly-tyr
V	Gly-gly-gly-tyr-gly-tyr-gly-gly
III	Gly-gly-tyr-gly +
II	Gly-tyr-gly-gly

Zur Veranschaulichung sind im Folgenden die Differenzen

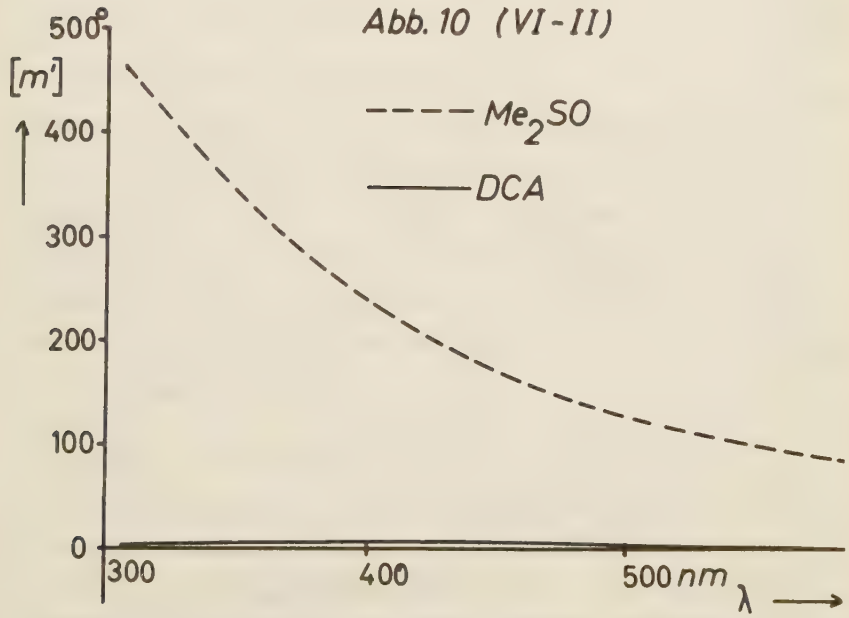
$$[m'] \text{ (VI)} - [m'] \text{ (II)} \qquad \text{(Abb.10)}$$

$$[m'] \text{ (IV)} - \frac{[m'] \text{ (III)} + [m'] \text{ (I)}}{2} \qquad \text{(Abb.11)}$$

und

$$[m'] \text{ (V)} - \frac{[m'] \text{ (III)} + [m'] \text{ (II)}}{2} \qquad \text{(Abb.12)}$$

in Dichloressigsäure und Dimethylsulfoxid dargestellt. Der schraffierte Bereich in Abb. 11 deutet die Meßfehlerbreite an (vgl. S.36)



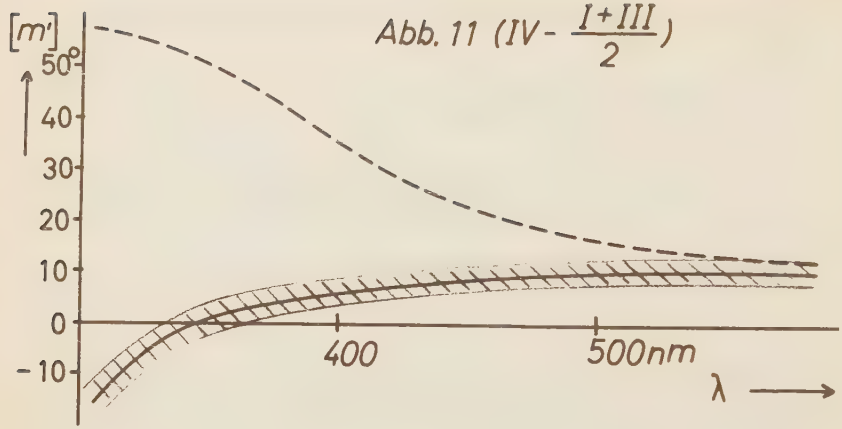


Abb. 11 ($IV - \frac{I+III}{2}$)

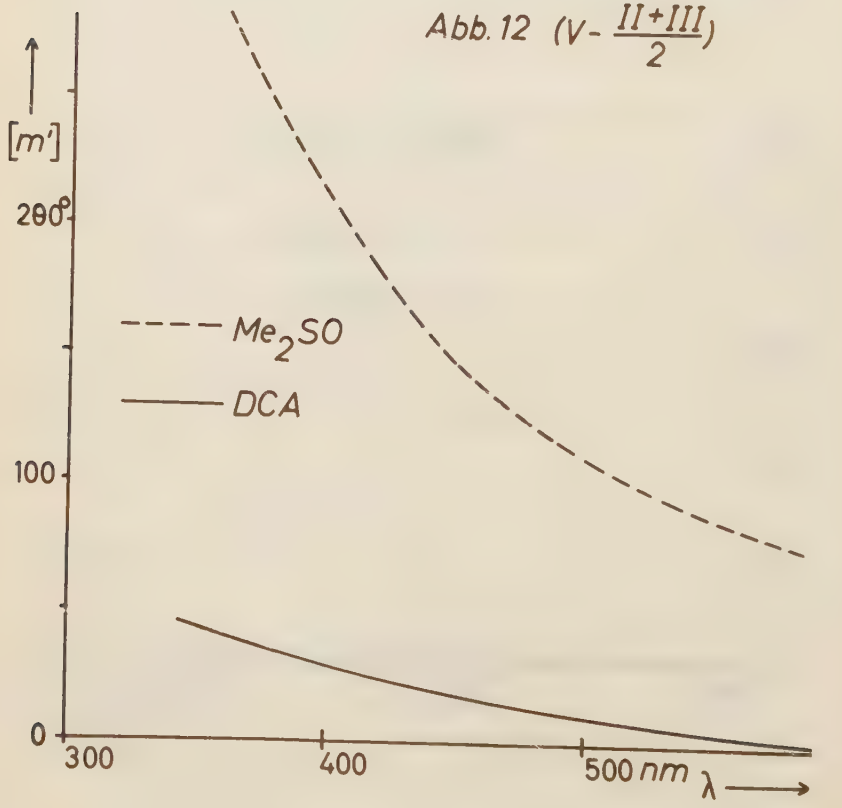


Abb. 12 ($V - \frac{II+III}{2}$)

Die sehr geringe Differenz der Dichloressigsäurewerte in Abb. 10 kann zufällig sein. Es hätte durchaus erwartet werden können, daß die Verknüpfung der beiden Tetrapeptidreste zu Drehungsänderungen an einem oder beiden Asymmetriezentren führt, die deutlich außerhalb der Meßfehlergrenze liegen. Erwartungsgemäß ist die Uebereinstimmung bei IV (Abb.11) und V (Abb.12) wesentlich schlechter. Grundsätzlich ist aber zu erkennen, daß die Differenzen in Dichloressigsäure klein gegen die in Dimethylsulfoxid sind und daß der in Dimethylsulfoxid auftretende konstellationsbedingte Drehungsbeitrag stets positiv ist. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit den Befunden an Polypeptiden, wo die Ausbildung einer rechtsgewendelten Helixstruktur im Normalfall immer einen positiven Drehungsbeitrag liefert (28).

Die Rotationsdispersionen in Wasser sind wenig charakteristisch. Im Hinblick auf die nur geringe Neigung von Peptiden zur Ausbildung von Wasserstoffbrücken in wäßriger Lösung (29) ist das nicht überraschend. Die Kurven zeigen für alle Tetra- und Octapeptide einen ähnlichen, angenähert normalen Verlauf. Bei Anwendung der Drude'schen Gleichung zeigt sich jedoch eine mehr oder weniger starke Abweichung vom normalen Verhalten.

In wäßriger Lösung können aber bei Polypeptiden durch Verschiebung des pH-Werts charakteristische Unterschiede der Rotationsdispersionen hervorgerufen werden. So kann durch Neutralisation der γ-Carboxylgruppen von Polyglutaminsäure die Helixstruktur aufgehoben werden (30). Auch bei Poly-

tyrosin wurde bei pH 10 bis etwa 11 eine Drehungsänderung beobachtet, die von den Autoren auf den Uebergang der ^{H}elixform in die ungeordnete Struktur zurückgeführt wurde (39).

Bei der Untersuchung der pH-Abhängigkeit der Rotationsdispersionen der vorliegenden Peptide ergab sich weder in diesem noch einem anderen Bereich ein deutlicher Unterschied im Verhalten zwischen Octa- und Tetrapeptiden. Abbildung 13 zeigt den Verlauf der Rotation des Octapeptids IV bei den fünf gemessenen Wellenlängen in Abhängigkeit vom pH-Wert. Diese Darstellung kann als typisch für das Verhalten aller sechs untersuchten Peptide gelten. Die Meßwerte für die übrigen Verbindungen sind im experimentellen Teil (S.58) angegeben.

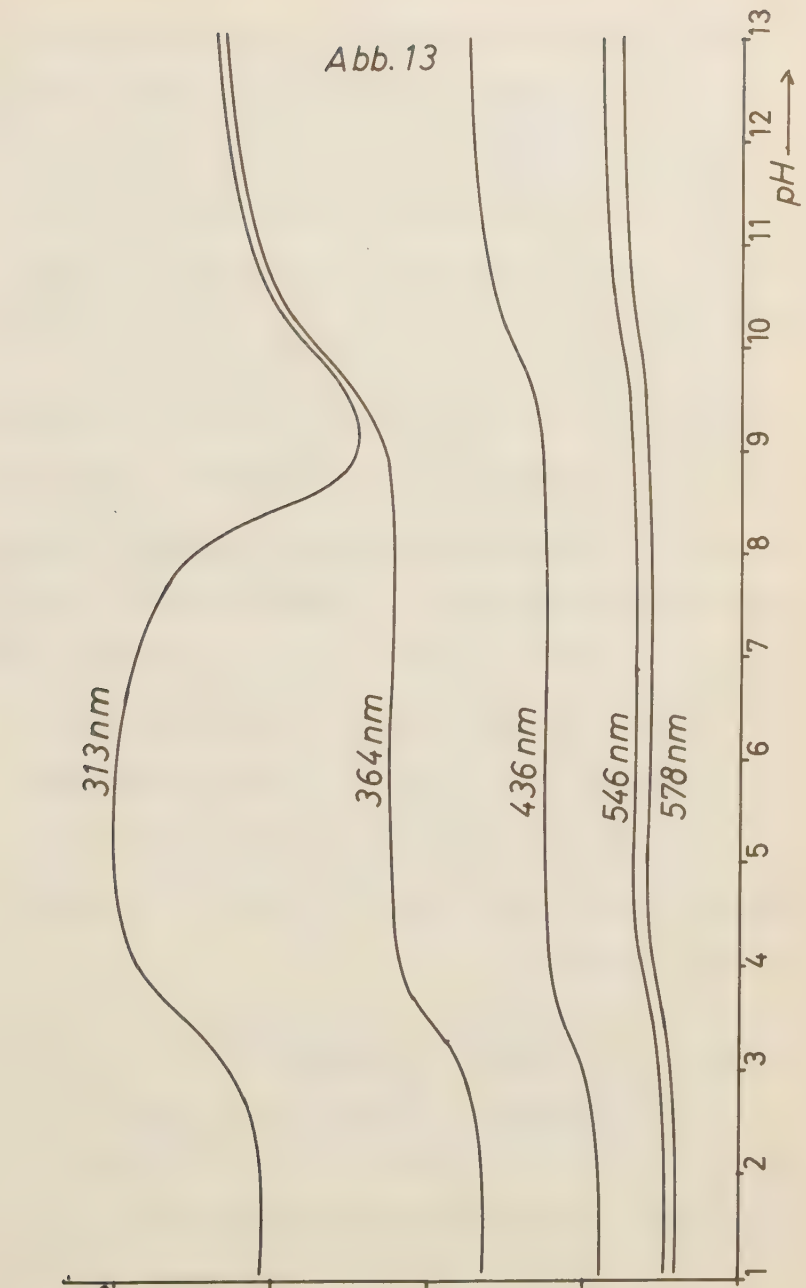


Abb. 13
[α]
200
150
100
50
0
313nm
364nm
436nm
546nm
578nm
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
pH

Auffallend ist der Sprung zwischen pH 8 und 9 bei 313 nm, weil er nur bei dieser einen Wellenlänge auftritt. Er kann nicht auf eine Änderung der Tyrosinabsorption durch Neutralisation des phenolischen Hydroxyls zurückgeführt werden. Die pK-Werte dieser Dissoziation liegen bei Tyrosin etwa um pH 10. Das Ultraviolettspektrum zeigt auch übereinstimmend für Tyrosin und die vorliegenden Peptide eine wesentliche Verschiebung der Absorption erst oberhalb pH 9.

Die Neutralisation der Aminogruppe kann zwar in diesem Bereich erfolgen (pH 7-9), doch kann sie nicht die Ursache für den Sprung der Drehung bei 313 nm sein. Auch Octa- und Tetrapeptide, in denen die endständige Aminogruppe durch den Carbobenzoxyrest geschützt ist, zeigen das gleiche Verhalten (vgl. S.60). Gegen die Vermutung, daß die Erscheinung durch Neutralisation der Aminogruppe zustande käme, spricht auch die Tatsache, daß damit keine so erhebliche spektrale Veränderung erklärt werden kann, wie sie diesem auffallenden Sprung bei nur einer Wellenlänge zu Grunde liegen müßte. Ein Uebergang von der Helix- zur ungeordneten Form muß als Ursache ausgeschlossen werden, weil auch die Tetrapeptide diesen Effekt zeigen.

Die übrigen Änderungen der Drehwerte werden stets von allen Wellenlängen gleichartig wiedergegeben, so die Neutralisation der Carboxylgruppe zwischen etwa pH 2 und 4 und die der phenolischen Hydroxylgruppe zwischen pH 9 und 11.

Eine Analyse der Rotationsdispersionen mit Hilfe der Drude'-

schen Gleichung ergab, wie bereits erwähnt, auch bei den scheinbar normalen Dispersionen in Wasser bzw. bei pH 6 keinen normalen Kurvenverlauf. Bei Anwendung der Moffit'-schen Gleichung lassen sich für alle Rotationsdispersionen, auch die in Dichloressigsäure und Dimethylsulfoxid, Werte für die Konstanten λ_o, a_o und b_o ermitteln. Da jedoch die λ_o-Werte in jedem Fall verschieden sind, fehlt die Voraussetzung für den Vergleich der b_o-Werte untereinander. Auch für gleiche Peptide in unterschiedlichen Lösungsmitteln und für verschiedene Peptide in den gleichen Lösungsmitteln werden immer unterschiedliche λ_o-Werte gefunden.

Beispiele für die Analyse von Rotationsdispersionen nach der Moffit'schen Gleichung sind im experimentellen Teil angegeben.

V. Diskussion

Die Rotationsdispersionen der Octapeptide wurden mit denen von Tetrapeptiden verglichen, die ganz oder angenähert ihrer Bausteinsequenz entsprachen. Dabei ergab sich je nach der Genauigkeit der Modelle eine mehr oder weniger gute Uebereinstimmung der molaren Drehwerte in Dichloressigsäure. Unter Wasserstoffbrücken lösenden Bedingungen setzt sich also die Rotation eines Octapeptids mit zwei Tyrosinresten angenähert additiv aus den Drehungsbeiträgen der beiden Asymmetriezentren zusammen.

In Dimethylsulfoxid, einem Wasserstoffbrücken stabilisierenden Lösungsmittel, besteht keine Additivität. Die Abweichung der Drehung des Octapeptids von der Summe der Drehungen der einzelnen 'Tetrapeptidbausteine' ist stets positiv. Es kann daraus auf eine gleichartige räumliche Orientierung bei allen drei Octapeptiden geschlossen werden. Es liegt nahe, eine helixartige Struktur zu vermuten, weil die von den Polymeren der meisten Aminosäuren gebildete rechtsgewendelte α-Helix auch einen positiven Drehungsbeitrag liefert.

Ein Vorliegen einer α-Helixstruktur auch in Dimethylformamid und Pyridin könnte eine Erklärung für die verhältnismäßig geringe Cyclisierungsneigung von Octapeptiden geben, die zum Mißlingen der Cyclisierungsversuche der vorliegenden Arbeit beitrug. In der durch Wasserstoffbrücken stabilisierten, verhältnismäßig starren Doppelwindung wären die

Endgruppen des linearen Octapeptids in einem Abstand fixiert, der keine intramolekulare Umsetzung erlaubt.

Die Rotationsdispersionen von bekannten cyclischen Hexapeptiden aus Glycin und Tyrosin oder Phenylalanin (5,6,9), die untereinander recht ähnlich sind, haben auch einige gemeinsame Merkmale mit denen der vorliegenden linearen Peptide.

Die Werte sind auch dort normalerweise in Dichloressigsäure positiv und in Dimethylsulfoxid negativ, zeigen also den gleichen Lösungsmitteleinfluß.

Die Dispersionskurven sind jedoch in beiden Lösungsmitteln scheinbar normal, während sie bei den linearen Peptiden deutlich anomal sind.

Bei dem mit VI vergleichbaren cyclo-(L-Phe-$(gly)_3$-L-phe-$(gly)_3$-) (Tyrosin kann ohne großen Fehler durch Phenylalanin ersetzt werden, vgl.(9),S.27) ist die Rotationsdispersion in Dichloressigsäure von 578 bis 364 nm ähnlich, bei 313 nm setzt sich der Einfluß der stark anomalen Dispersion des linearen Peptids durch: Seine Drehung ist hier wesentlich kleiner. In Dimethylsulfoxid dreht das lineare Peptid bei allen Wellenlängen deutlich stärker negativ, ein Unterschied, der mit der Strukturänderung durch die Cyclisierung in Zusammenhang gebracht werden kann. Da das stark anomale Verhalten der Rotationsdispersionen der vorliegenden linearen Peptide auch in Dichloressigsäure eine genauere Analyse nicht zuläßt, sind auch über die Beziehungen zum Verhalten der Cyclopeptide keine genaueren Aussagen möglich.

VI. Experimenteller Teil

Die angegebenen Schmelzpunkte wurden in offener Kapillare im Paraffinbad bestimmt. Sie sind nicht korrigiert.

Die optischen Drehwinkel wurden mit einem photoelektrischen Polarimeter der Firma Perkin-Elmer, Typ 141, mit einer Natriumlampe (589 nm) bzw. einer Quecksilberdampflampe bei den Wellenlängen 313, 364, 436, 546 und 578 nm in jedem Falle bei 20° gemessen. Die Konzentration war, wenn nicht anders angegeben, 0,5 g je 100 ccm (Einwaage ± 10%). Für die angegebenen spezifischen Drehwinkel [α] wird ein Fehler von ±(0,5°+ 0,005[α]) angenommen.

Die Ausbeuten sind Rohausbeuten, bezogen auf die erste Isolierung des Reaktionsproduktes, die in der Regel nach dem ersten Umkristallisieren vorgenommen wurde.

Die Papierchromatogramme wurden nach dem Rundfilterverfahren auf Papier der Firma Schleicher u.Schüll Nr. 2043 B hergestellt. Als Lösungsmittel wurden Gemische von 80 Vol. Methyläthylketon, 5 Vol. Pyridin und 15 Vol. Wasser (Lösungsmittel A) bzw. von 100 Vol. Methyläthylketon, 50 Vol. Wasser und 40 Vol. n-Butanol (Lösungsmittel B) verwendet.

Wenn R_F-Werte angegeben sind, können sie aber nicht zur Charakterisierung der einzelnen Substanz dienen, weil die untereinander isomeren Verbindungen (z.B. alle Carbobenzoxytetrapeptidcarbonsäuren) stets gleiche oder sehr ähn-

liche R_f-Werte haben. Die Genauigkeit der R_f-Werte ist nicht größer als ± 0,02. Zur Unterscheidung von Substanzen sind im allgemeinen Differenzen von 0,05 Einheiten erforderlich.

A. Präparative Vorschriften

N-Carbobenzoxy-diglycylglycin-cyanmethylester

2,5 g (0,02 Mol) N-Carbobenzoxytriglycin (35) wurden mit 4,5 g (0,06 Mol) Chloracetonitril übergossen und auf 0° abgekühlt. Dann wurden in mehreren Portionen 4 ccm (ca. 0,03 Mol) Triäthylamin unter Schütteln zugesetzt. Das Reaktionsgemisch verflüssigte sich bei fortwährendem Schütteln bald zu einem farblosen bis hellgelblichen Sirup. Es wurde dabei nicht weiter gekühlt. Nach etwa einer halben Stunde wurde auf dem Wasserbad auf ca. 60° erwärmt, wobei die Masse auskristallisierte. Sie wurde zerstoßen und kurze Zeit mit Essigester am Rückfluß erwärmt. Der Essigester wurde nach dem Erkalten abgesaugt und der Rückstand aus 80-proz. Aethanol umkristallisiert.

Ausbeute: 6 g = 83 %

Schmp. : 187°

$C_{16}H_{18}O_6N_4$ (362,35)

Ber.: C 53,03 % H 5,01 % N 15,46%

Gef.: C 52,97 % H 4,80 % N 15,38%

N-Carbobenzoxy-diglycyl-glycyl-L-tyrosin-methylester

10,9 g (0,03 Mol) N-Carbobenzoxy-diglycyl-glycin-cyanmethylester und 11,7 g (0,06 Mol) L-Tyrosinmethylester wurden mit 10 ccm Dimethylformamid und 90 ccm absolutem Tetrahydrofuran übergossen, mit einigen Tropfen Eisessig versetzt und 4 Stunden am Rückfluß erwärmt. Die fast klare Lösung wurde bis zu ungefähr 50° Wasserbadtemperatur im Vakuum eingedampft, der viskose Rückstand in 150 ccm Methanol gelöst und die Lösung filtriert. Dann wurde mit etwa 400 ccm Methyläthylketon verdünnt und zur Kristallisation stehen gelassen. Nach 24 Stunden wurde abgesaugt, mit Methyläthylketon gewaschen und noch einmal aus Methanol/Methyläthylketon umkristallisiert .

Ausbeute: 10,5 g = 70%

Schmp.: 151° $[\alpha]_D^{20} = 13,8°$ (c = 0,5 in Methanol)

$C_{24}H_{28}N_4O_8$ (500,52)

Ber.:	C 57,59	H 5,64	N 11,20
Gef.:	C 58,00	H 5,85	N 10,96

N-Carbobenzoxy-triglycyl-L-tyrosin

5 g (0,01 Mol) N-Carbobenzoxy-triglycyl-L-tyrosin-methylester wurden in 20 ccm Methanol aufgeschlämmt und unter Rühren mit 8 ccm 2 n wäßriger NaOH versetzt. Die gelbliche Lösung wurde nach 10 Minuten von dem geringen Rückstand abgesaugt und unter Eiskühlung mit konzentrierter HCl angesäuert. Das ausgefallene zähe Oel kristallisierte beim Rühren und Impfen mit Kristallen der Verbindung durch. Es wurde abgesaugt und aus 80-proz. Äthanol umkristallisiert.

Ausbeute: 3,8 g = 78 %

Schmp.: 155-161° ; $[\alpha]_D^{20}$ = 22,6° (c = 0,5 in 60-proz. Methanol)

R_F = 0,64 (Lösungsmittel A)

$C_{23}H_{26}N_4O_8$ (486,49)

Ber.:	C 56,78	H 5,39	N 11,52
Gef.:	C 57,10	H 5,76	N 11,25

N-Carbobenzoxy-triglycyl-L-tyrosin-cyanmethylester

4,9 g (0,01 Mol) N-Carbobenzoxy-triglycyl-L-tyrosin wurden mit 5 g Chloracetonitril übergossen und auf 0° abgekühlt. Dann wurden portionsweise unter Umschütteln 2 ccm Triäthylamin zugesetzt. Die Masse wurde weiter geschüttelt und gekühlt, bis sich ein homogener Sirup gebildet hatte. Es wurde nun noch 1/2 Stunde auf 40° erwärmt. Nach dem Abkühlen wurde die Masse mit etwa 70 ccm Essigester und 30 ccm Wasser geschüttelt. Der Cyanmethylester kristallisiert dabei nach einiger Zeit in feinen Nädelchen aus und kann abgesaugt werden. Er wurde aus ca. 40-proz. Äthanol umkristallisiert. Die Verbindung kristallisiert mit 1 Mol Äthanol.

Ausbeute: 3,5 g = 61 %

Schmp.: 124° ; $[\alpha]_D^{20}$ = 6,2° (c = 0,5 in 80-proz. Äthanol)

$C_{25}H_{27}N_5O_8 \cdot C_2H_5OH$ (571,60)

Ber.:	C 56,73	H 5,82	N 12,25
Gef.:	C 56,79 56,76	H 5,96 5,70	N 11,91 11,75

Triglycyl-L-tyrosin (I)

3 g $PdO/BaSO_4$ - Katalysator (35) wurden in 50 ccm bidestilliertem Wasser 30 Minuten unter Hindurchleiten von Wasserstoff aktiviert. Dann wurde eine Lösung von 4,9 g (0,01 Mol) N-Carbobenzoxy-triglycyl-L-tyrosin in 100 ccm 80-proz. Essigsäure zugesetzt. Die Hydrierung dauerte etwa 3 Stunden. Das entstandene Kohlendioxid wurde zur Kontrolle in einem Absorptionsröhrchen mit Natronkalk und Natronasbest aufgefangen. Das Reaktionsgemisch wurde zentrifugiert. Der Rückstand wurde mit bidestilliertem Wasser aufgeschlämmt, auf etwa 40° erwärmt und nochmals abzentrifugiert. Die vereinigten klaren Lösungen wurden im Vakuum eingedanpft, der Rückstand in Wasser gelöst und nochmals eingedampft. Beim Wiederauflösen in Wasser zeigte sich eine geringe Trübung, die offenbar von nicht umgesetzter Carbobenzoxyverbindung herrührte. Die wäßrige Lösung wurde mehrmals mit Essigester ausgeschüttelt und wiederum zur Trockne eingedampft. Der Rückstand wurde in etwa 30 ccm Wasser gelöst und bis zur starken Trübung mit Äthanol versetzt. Das Peptid kristallisierte im Laufe von 24 Stunden und wurde durch mehrfaches Umfällen aus Wasser/Äthanol gereinigt. Nach mehrstündigem Trocknen bei 80° und 12 Torr über Phosphorpentoxid enthielt die Verbindung noch 1/2 Mol Wasser. Die in der Literatur beschriebene (34), auf anderem Wege erhaltene Verbindung enthielt 1 Mol Wasser und hatte geringfügig abweichende Eigenschaften.

Ausbeute: 2,7 g = 76 %

Schmp.: (gef.) 192-200° (Z) R_F (gef.) = 0,16 (Lsgsm.A)
(Lit.) 180-184° (Z)

$[\alpha]_D^{20}$ (gef.) = 41,5° (c = 0,5 in Wasser)

$[\alpha]_D^{20}$ (Lit.) = 39,7° (c = 2 in Wasser)

$C_{15}H_{20}N_4O_6 \cdot 1/2\ H_2O$ (361,37)

Ber.:	C	49,85	H	5,86	N 15,51
Gef.:	C	49,82 49,75	H	6,20 6,14	N 15,68 15,53

Triglycyl-L-tyrosin-methylester-Hydrobromid

15 g (0,3 Mol) N-Carbobenzoxy-triglycyl-L-tyrosin-methylester wurden in 30 ccm Eisessig aufgeschlämmt und mit 17 ccm 37-proz. HBr/Eisessig übergossen. Unter gelegentlichem Umschütteln wurde das Gemisch etwa 3/4 Stunden stehen gelassen. Dabei war die Carbobenzoxyverbindung vollständig in Lösung gegangen, während sich das Hydrobromid als ölige Masse ausgeschieden hatte. Das Gemisch wurde im Vakuum destilliert, bis bei 30° Badtemperatur nichts mehr überging. Der Rückstand wurde in etwa 250 ccm Wasser aufgenommen und dreimal mit Essigester ausgeschüttelt. Die wäßrige Lösung wurde im Vakuum eingedampft, wobei die Badtemperatur unter 30° gehalten wurde. Die Restlösung wurde noch in dünnflüssigem Zustand mit Äthanol verdünnt und fast bis zur Trockne eingedampft. Dabei schied sich schon ein großer Teil des Hydrobromids in dichten Kristallen ab. Die Ausfällung wurde durch Zusatz von Äthanol vervollständigt. Nach dem Absaugen und Waschen mit Äthanol und Äther war das Produkt schon fast rein und konnte direkt weiterverarbeitet

werden. Zur Analyse wurde aus Äthanol umkristallisiert.

Ausbeute: 11,3 g = 84 % ; R_F = 0,59 (Lsgsm. A)

Schmp.: 225-228° (Z); $[\alpha]_D^{20}$ = 11,1° (c = 0,5 in Wasser)

$C_{16}H_{23}N_4O_6Br$ (447,31)

Ber.:	N 12,53	Br^-	17,87
Gef.:	N 12,91	Br^-	18,21

N-Carbobenzoxy-glycyl-L-tyrosyl-glycyl-glycin-äthylester

11,6 g (0,03 Mol) N-Carbobenzoxy-glycyl-L-tyrosin-hydrazid (36) wurden in 150 ccm Eisessig, 25 ccm 5 n HCl und 150 ccm Wasser in der angegebenen Reihenfolge gelöst. Die Lösung wurde auf -10° gekühlt und in einem Guß mit der Lösung von 2,3 g (0,033 Mol) $NaNO_2$ in wenig Wasser versetzt. Nach gutem Umschwenken wurde 3 Minuten in der Kälte stehen gelassen und dann in eine Mischung von 800 ccm Essigester und 500 g Eis gegossen. Die wäßrige Phase wurde noch zweimal mit je 300 ccm Essigester ausgeschüttelt. Die vereinigten Essigesterlösungen wurden mehrmals mit Eiswasser und dann mit eisgekühlter Natriumbicarbonatlösung ausgeschüttelt, bis die wäßrige Phase neutral blieb. Die Azidlösung wurde eine Stunde über Natriumsulfat getrocknet, abfiltriert und mit einer eisgekühlten Aufschlämmung von 10 g (0,05 Mol) Glycyl-glycin-äthylester-Hydrochlorid (39) und 10 ccm Triäthylamin in 200 ccm Essigester versetzt. Nach 24 Stunden wurde die Lösung mit Wasser, 0,5 n HCl und gesättigter $NaHCO_3$-Lösung ausgeschüttelt und eingedampft. Der Rückstand wurde zuerst aus wenig Äthanol, dann aus Aceton/

Wasser-Gemisch 1 : 3 umkristallisiert.

Ausbeute: 10,5 g = 68 %

Schmp.: 154°; $[\alpha]_D^{20}$ = 5,9° (c = 0,5 in 80-proz. Äthanol)

$C_{25}H_{30}N_4O_8$ (514,55)

Ber.:	C	58,35	H	5,88	N 10,89
Gef.:	C	58,66	H	5,82	N 10,82

N-Carbobenzoxy-glycyl-L-tyrosyl-glycyl-glycin

5,1 g (0,01 Mol) N-Carbobenzoxy-glycyl-L-tyrosyl-glycyl--glycin-äthylester wurden in 20 ccm Methanol aufgeschlämmt und unter Rühren mit 10 ccm 2 n wäßriger NaOH versetzt. Nach 10 Minuten wurde von dem geringen Rückstand abgesaugt und mit konzentrierter Salzsäure angesäuert. Das ausgefallene Oel wurde in Essigester aufgenommen und die Lösung mit Wasser ausgeschüttelt. Dann wurde mehrmals mit gesättigter $NaHCO_3$-Lösung ausgezogen, und die vereinigten Auszüge wurden mit Essigester geschüttelt. Das Peptid wurde dann durch Ansäuern wieder in Essigester übergeführt, die Lösung kurz mit Natriumsulfat getrocknet und eingedampft. Die zuletzt beschriebenen Maßnahmen müssen rasch durchgeführt werden, weil das Peptid aus der Essigesterlösung auszukristallisieren beginnt. Die Verbindung wurde aus etwa 40-proz. Äthanol umkristallisiert. Für die auf anderem Wege schon früher hergestellte Verbindung (37) war ein deutlich tieferer Schmelzpunkt angegeben worden.

Ausbeute: 2,7 g = 56 %

Schmp.: (gef.) 184° R_F (gef.) = 0,64 (Lsgsm. A)

Schmp.: (Lit.) 175-177°

$[\alpha]_D^{20}$ (gef.) = +6,4° (c = 0,5 in 80-proz. Äthanol)

$[\alpha]_D^{20}$ (Lit.) = -3,5° (c = 2 in Dimethylformamid)

$C_{23}H_{26}N_4O_8$ (486,49)

Ber.:	C	56,78	H	5,39	N 11,52
Gef.:	C	56,95 56,89	H	5,77 6,02	N 11,52

N-Carbobenzoxy-glycyl-L-tyrosyl-glycyl-glycin-cyanmethylester

4,9 g (0,01 Mol) N-Carbobenzoxy-glycyl-L-tyrosyl-glycyl--glycin wurden mit 4 g Chloracetonitril übergossen und im Eisbad auf 0° abgekühlt. Dann wurden 2 ccm Triäthylamin zugesetzt, und das Reaktionsgemisch wurde so lange geschüttelt, bis sich ein klarer Sirup gebildet hatte. Es wurde noch 1/2 Stunde auf 40° erwärmt und dann in Essigester und Wasser aufgenommen. Die wäßrige Phase wurde noch zweimal mit Essigester ausgeschüttelt, und die vereinigten Essigesterlösungen wurden nacheinander mit Wasser, 0,5 n HCl, gesättigter $NaHCO_3$-Lösung und Kochsalzlösung geschüttelt. Die getrocknete Lösung wurde eingedampft und der Rückstand aus Äthanol umkristallisiert.

Ausbeute: 3,7 g = 70 %

Schmp.: 166°; $[\alpha]_D^{20}$ = 7,3° (c = 0,5 in 80-proz.Äthanol)

$C_{25}H_{27}N_5O_8$ (525,53)

Ber.:	C	57,14	H	5,18	N 13,33
Gef.:	C	57,00 57,00	H	5,43 5,65	N 13,46

Glycyl-L-tyrosyl-glycyl-glycin-äthylester-Hydrobromid

5,1 g (0,01 Mol) N-Carbobenzoxy-glycyl-L-tyrosyl-glycyl--glycin-äthylester wurden in 10 ccm Eisessig aufgeschlämmt und mit 4,5 ccm 37-proz. HBr/Eisessig übergossen. Das Peptid löste sich sofort auf. Es mußte dabei etwas gekühlt werden. Nach einer Stunde war das Hydrobromid als Oel ausgefallen. Es wurde, wie beim Triglycyl-L-tyrosin-methylester-Hydrobromid beschrieben, aufgearbeitet. Beim Eindampfen der wäßrigen Lösung mußte noch ein- bis zweimal zwischendurch von auskristallisierenden Resten der Carbobenzoxyverbindung abgesaugt werden. Das Hydrobromid kristallisierte erst, nachdem die alkoholische Lösung mehrmals durch Azeotropdestillation mit Toluol vom Wasser befreit worden war. Es wurde aus Äthanol umkristallisiert.

Ausbeute: 2,4 g = 52 % ; R_F = 0,61 (Lsgsm. B)

Schmp.: 188-192° (Z); $[\alpha]_D^{20}$ = 17,4° (c= 1 in Wasser)

$C_{17}H_{25}N_4O_6]Br$ (461,34)

Ber.: Br^- 17,32

Gef.: Br^- 17,54

Glycyl-L-tyrosyl-glycyl-glycin (II)

4,9 g (0,01 Mol) N-Carbobenzoxy-glycyl-L-tyrosyl-glycyl--glycin wurden, wie unter Triglycyl-L-tyrosin beschrieben, mit 3 g $PdO/BaSO_4$ als Katalysator hydriert. Das Produkt wurde in Wasser gelöst und mit Aceton ausgefällt. Die Kristallisation erfolgt sehr langsam. Für die schon früher auf anderem Wege hergestellte Verbindung wurden in der Literatur ein höherer Schmelzpunkt und eine kleinere Drehung angegeben (37).

Ausbeute: 2,5 g = 71 % ; R_F = 0,23 (Lsgsm. A)

Schmp.: (gef.) 223-227° (Z)

Schmp.: (Lit.) 243° (Z)

$[\alpha]_D^{20}$ (gef.) = 23,4° (c= 0,5 in Wasser)

$[\alpha]_D^{15}$ (Lit.) = 18,3° (c= 2 in Wasser)

$C_{15}H_{20}N_4O_6$ (352,36)

Ber.:	C	51,13	H	5,72	N 15,90
Gef.:	C	51,21	H	5,75	N 16,20

N-Carbobenzoxy-glycyl-glycyl-L-tyrosyl-glycin-äthylester

8,9 g (0,02 Mol) N-Carbobenzoxy-diglycyl-L-tyrosin-hydrazid (38) wurden in 100 ccm Eisessig, 10 ccm konz. Salzsäure und 100 ccm Wasser gelöst und auf -8° gekühlt. Dann wurde unter Umschwenken eine Lösung von 1,4 g $NaNO_2$ in wenig Wasser zugesetzt. Die Lösung wurde noch 3 Minuten im Kältebad stehen gelassen und dann in einen Schütteltrichter mit 500 ccm Essigester, 300 ccm Wasser und etwa 200 g Eis gegossen.Die wäßrige Phase wurde noch zweimal mit je 400 ccm Essigester ausgeschüttelt. Die gesamte Essigesterlösung wurde wie üblich mit Wasser und $NaHCO_3$-Lösung neutral gewaschen und getrocknet. Dann wurde eine Lösung von 0,04 Mol Glycinäthylester, die aus 5,6 g Glycinäthylester-Hydrochlorid und 5,7 ccm Triäthylamin in absolutem Tetrahydrofuran bereitet worden war, zugesetzt. Nach 24 Stunden war das Tetrapeptid zum größten Teil ausgefallen und wurde abfiltriert. Die Essigesterlösung wurde in üblicher Weise aufgearbeitet und ihr Rückstand mit dem Niederschlag ver-

einigt. Es wurde aus 80-proz. Äthanol umkristallisiert.

Ausbeute: 7,4 g = 72 %

Schmp.: 209° ; $[\alpha]_D^{20}$ = 3,3° (c = 0,5 in 80-proz. Äthanol)

$C_{25}H_{30}N_4O_8$ (514,55)

Ber.:	C	58,35	H	5,88	N 10,89
Gef.:	C	58,61 58,49	H	5,73 5,57	N 11,12

N-Carbobenzoxy-diglycyl-L-tyrosyl-glycin

5,1 g (0,01 Mol) N-Carbobenzoxy-diglycyl-L-tyrosyl-glycin--äthylester wurden fein gepulvert und in 15 ccm Methanol und 20 ccm 1 n wäßriger NaOH verseift. Es wurde wie üblich aufgearbeitet. Das Produkt wurde aus 80-proz. Äthanol und dann aus einem Gemisch von 5 Teilen Wasser und 1 Teil Aceton umkristallisiert. Die Verbindung enthielt nach dem Trocknen bei 80° und 12 Torr über Phosphorpentoxid noch 1/2 Mol Kristallwasser.

Ausbeute: 3,5 g = 72 %; R_F = 0,66 (Lösungsmittel A)

Schmp.: 170-173°; $[\alpha]_D^{20}$ = 7,1° (c = 0,5 in 80-proz. Äthanol)

$C_{23}H_{26}N_4O_8 \cdot 1/2\ H_2O$ (495,50)

Ber.:	C	55,75	H	5,49	N 11,31
Gef.:	C	55,86 56,06	H	5,55 5,69	N 11,31 11,02

Diglycyl-L-tyrosyl-glycin (III)

2 g (0,004 Mol) N-Carbobenzoxy-diglycyl-L-tyrosyl-glycin wurden in der beim Triglycyl-L-tyrosin beschriebenen Weise mit 2 g $PdO/BaSO_4$ als Katalysator hydriert und isoliert.

Das Peptid wurde in Wasser gelöst und mit Äthanol bis zur beginnenden Trübung versetzt. Es kristallisiert in langen Nadeln. Die Reinigung wurde mehrmals wiederholt. Nach dem Trocknen bei 80° und 12 Torr bleibt ein Rest von 1/2 Mol Kristallwasser.

Ausbeute: 0,7 g = 50 %; R_F = 0,20 (Lösungsmittel A)
Schmp.: 230-234° (Z); $[\alpha]_D^{20}$ = 3,4° (c = 0,5 in Wasser)

$C_{15}H_{20}N_4O_6 \cdot 1/2\ H_2O$ (361,37)

Ber.:	C	49,85	H	5,86	N 15,51
Gef.:	C	49,94	H	6,05	N 15,10

N-Carbobenzoxy-triglycyl-L-tyrosyl-glycyl-L-tyrosyl--glycyl-glycin-äthylester

2,9 g (0,005 Mol) N-Carbobenzoxy-triglycyl-L-tyrosin-cyanmethylester und 3,5 g (0,0075 Mol) Glycyl-L-tyrosyl-glycyl--glycin-äthylester-Hydrobromid wurden in ca. 20 ccm Dimethylformamid gelöst. Dann wurden 1,2 ccm Triäthylamin und wenige Tropfen Eisessig zugesetzt. Das Reaktionsgemisch wurde 2 Tage stehen gelassen und das Dimethylformamid im Vakuum abdestilliert. Der Rückstand wurde mit 50 ccm Wasser gründlich verrieben, abgesaugt und mit Wasser gewaschen. Zur weiteren Reinigung wurde das Octapeptid noch feucht in Essigester und Äthanol gelöst und zur Entfernung des unumgesetzten Cyanmethylesters mit $NH_4Cl/(NH_4)_2CO_3$-Lösung und anschließend mit etwa 0,5 n HCl ausgeschüttelt. Die Mengen der wäßrigen Lösungen wurden so klein wie möglich gehalten, weil auch das Octapeptid darin etwas löslich ist.

Der Rückstand der organischen Phase wurde mehrmals aus einem Gemisch von 50 Vol. Wasser, 50 Vol. Methanol und 10 Vol. Essigester umkristallisiert.

Ausbeute: 2,5 g = 59 %; R_F = ca. 0,90-0,95 (Lsgsm. B)

$[\alpha]_D^{20}$ = 12,0° (c = 0,5 in 80-proz. Äthanol)

Schmp.: 196-201°

$C_{40}H_{48}N_8O_{13}$ (848,89)

Ber.: C 56,60 H 5,70 N 13,20

Gef.: C 56,48 H 6,00 N 12,91

N-Carbobenzoxy-triglycyl-L-tyrosyl-glycyl-L-tyrosyl--glycyl-glycin

1,7 g (0,002 Mol) N-Carbobenzoxy-triglycyl-L-tyrosyl--glycyl-L-tyrosyl-glycyl-glycin-äthylester wurden in etwa 15 ccm Methanol und 5 ccm Wasser warm gelöst und abgekühlt, worauf die Lösung zum Gel erstarrte. Dann wurden 3 ccm 2 n NaOH zugesetzt und damit geschüttelt. Nach 10 Minuten wurde vom Ungelösten abzentrifugiert und angesäuert. Das Peptid wurde in Essigester aufgenommen und die Lösung mehrmals mit wenig Wasser, gegebenenfalls unter Zusatz von Methanol, ausgeschüttelt. Der Rückstand der Essigesterlösung wurde aus 60-proz. Methanol umkristallisiert.

Ausbeute: 1,0 g = 61 %; R_F = 0,67 (Lösungsmittel A)

Schmp.: 160-166° ; $[\alpha]_D^{20}$ = 12,0° (c = 0,5 in 80-proz. Äthanol)

$C_{38}H_{44}N_8O_{13}$ (820,83)

Ber.: C 55,60 H 5,40 N 13,65

Ber.:	C 55,60	H 5,40	N 13,65
Gef.:	C 55,58	H 5,73	N 13,67

Triglycyl-L-tyrosyl-glycyl-L-tyrosyl-glycyl-glycin (V)

1,06 g (0,0013 Mol) N-Carbobenzoxy-triglycyl-L-tyrosyl-glycyl-L-tyrosyl-glycyl-glycin wurden in 70 ccm 80-proz. Essigsäure gelöst und zu 1 g $PdO/BaSO_4$-Katalysator gegeben, der in 20 ccm Wasser 20 Minuten vorhydriert worden war. Nach zwei Stunden war die Hydrierung beendet. Das Reaktionsgemisch wurde zentrifugiert und der Rückstand mit warmem Wasser aufgeschlämmt und nochmals abzentrifugiert. Die vereinigte Lösung wurde eingedampft und der Rückstand mehrmals aus wenig 50-proz. Äthanol umkristallisiert. Die Verbindung enthielt nach Trocknen bei 80° und 12 Torr über Phosphorpentoxid noch 1 Mol Wasser.

Ausbeute: 450 mg = 51 % ; R_F = 0,34 (Lösungsmittel A)

Schmp.: 204-209° (Z); $[\alpha]_D^{20}$ = 18,0° (c = 0,5 in Wasser)

$C_{30}H_{38}N_8O_{11}\cdot H_2O$ (704,71)

Ber.:	C 51,13	H 5,72	N 15,90
Gef.:	C 50,98	H 5,81	N 16,16 15,96

N-Carbobenzoxy-triglycyl-L-tyrosyl-triglycyl-L-tyrosin-methylester

2,9 g (0,005 Mol) N-Carbobenzoxy-triglycyl-L-tyrosin-cyanmethylester und 3,4 g (0,0075 Mol) Triglycyl-L-tyrosin-methylester-Hydrobromid wurden in 20 ccm Dime-

thylformamid mit 1,2 ccm Triäthylamin unter Zusatz von einigen Tropfen Eisessig umgesetzt. Der Octapeptidester wurde,wie beim N-Carbobenzoxy-triglycyl-L-tyrosyl-glycyl--L-tyrosyl-glycyl-glycinäthylester beschrieben, isoliert und gereinigt. Die Verbindung enthielt nach Trocknen bei 80° und 12 Torr über Phosphorpentoxid noch 1 Mol Methanol.

Ausbeute: 2,3 g = 55 % ; R_F = 0,90-0,95 (Lösungsmittel B)
Schmp.: 180-190°; $[\alpha]_D^{20}$ = 18,0° (c = 0,5 in 80-proz. Äthanol)

$C_{39}H_{46}N_8O_{13} \cdot CH_3OH$ (866,90)

Ber.:	C	55,42	H	5,81	N 12,93
Gef.:	C	55,45	H	5,55	N 12,80

N-Carbobenzoxy-triglycyl-L-tyrosyl-triglycyl-L-tyrosin

1,67 g (0,002 Mol) N-Carbobenzoxy-triglycyl-L-tyrosyl-triglycyl-L-tyrosinmethylester wurden, wie beim N-Carbobenzoxy-triglycyl-L-tyrosyl-glycyl-L-tyrosyl-glycyl-glycin beschrieben, verseift. Die Verbindung wurde aus 80-proz. Äthanol umkristallisiert. Sie enthielt nach dem Trocknen noch ein Mol Äthanol.

Ausbeute: 1,1 g = 67 % ; R_F = 0,67 (Lösungsmittel A)
Schmp.: 170-180°; $[\alpha]_D^{20}$ - 22,1° (c = 0,5 in 80-proz. Äthanol)

$C_{38}H_{44}N_8O_{13} \cdot C_2H_5OH$ (866,90)

Ber.:	C	55,42	H	5,81	N 12,93
Gef.:	C	55,61 55,40	H	5,92 6,09	N 13,25

Triglycyl-L-tyrosyl-triglycyl-L-tyrosin (IV)

1,9 g (0,0022 Mol) N-Carbobenzoxy-triglycyl-L-tyrosyl-triglycyl-L-tyrosin wurden in der unter Triglycyl-L-tyrosyl--glycyl-L-tyrosyl-glycyl-glycin beschriebenen Weise mit 2 g $PdO/BaSO_4$-Katalysator hydriert. Die nach dem Abzentrifugieren des Katalysators erhaltene Lösung wurde mehrmals eingeengt, mit Wasser verdünnt und wieder auf ein kleines Volumen eingeengt. Dann wurde mit einem großen Ueberschuß Methanol verdünnt und über Nacht stehen gelassen. Das gallertartig ausgefallene Peptid wurde noch mehrmals in wenig Wasser gelöst und mit viel Methanol ausgefällt. Nach dieser Vorreinigung konnte das Octapeptid aus sehr wenig Wasser umkristallisiert werden. Obwohl es noch einige Male auf diese Weise gereinigt wurde, verblieb nach dem Trocknen in üblicher Weise ein Gehalt von 1 Mol Methanol.

Ausbeute: 0,9 g = 57 % ; R_F = 0,35 (Lösungsmittel A)

Schmp.: 190-200° (Z) ; $[\alpha]_D^{20}$ = 28,2° (c = 0,5 in Wasser)

$C_{30}H_{38}N_8O_{11} \cdot CH_3OH$ (718,74)

Ber.:	C	51,80	H	5,89	N 15,59
Gef.:	C	51,93	H	5,72	N 15,51

N-Carbobenzoxy-glycyl-L-tyrosyl-triglycyl-L-tyrosyl--glycyl-glycin-äthylester

2,6 g (0,005 Mol) N-Carbobenzoxy-glycyl-L-tyrosyl-glycyl--glycin-cyanmethylester und 3,5 g (0,0075 Mol) Glycyl-L-tyrosyl-glycyl-glycin-äthylester-Hydrobromid wurden in 20

ccm Dimethylformamid mit 1,2 ccm Triäthylamin unter Zusatz von wenig Eisessig umgesetzt. Der Octapeptidester wurde, wie beim N-Carbobenzoxy-triglycyl-L-tyrosyl-triglycyl-L--tyrosin-methylester beschrieben, isoliert und aus 90-proz. Äthanol umkristallisiert. Die Verbindung enthielt nach dem Trocknen noch 1 Mol Wasser.

Ausbeute: 2,2 g = 52 % ; R_F = 0,90-0,95 (Lösungsmittel B)

Schmp.: 170-175°; $[\alpha]_D^{20}$ = 8,3° (c = 0,5 in 80-proz. Äthanol)

$C_{40}H_{48}N_8O_{13} \cdot H_2O$ (866,90)

Ber.:	C	55,42	H	5,81	N 12,93
Gef.:	C	55,77	H	6,06	N 13,04

N-Carbobenzoxy-glycyl-L-tyrosyl-triglycyl-L-tyrosyl--glycyl-glycin

1,7 g (0,002 Mol) N-Carbobenzoxy-glycyl-L-tyrosyl-triglycyl--L-tyrosyl-glycyl-glycin-äthylester wurden, wie beim N-Carbobenzoxy-triglycyl-L-tyrosyl-triglycyl-L-tyrosin beschrieben, verseift und dann aus 60-proz. Methanol umkristallisiert. Die Verbindung enthielt nach dem Trocknen 2 Mol Wasser.

Ausbeute: 0,9 g = 55 % ; R_F = 0,67 (Lösungsmittel A)

Schmp.: 140-145°; $[\alpha]_D^{20}$ = 9,3° (c = 0,5 in 80-proz. Äthanol)

$C_{38}H_{44}N_8O_{13} \cdot 2\ H_2O$ (856,87)

Ber.:	C	53,27	H	5,65	N 13,08
Gef.:	C	53,08	H	5,90	N 13,43

Glycyl-L-tyrosyl-triglycyl-L-tyrosyl-glycyl-glycin (VI)

2,05 g (0,0024 Mol) N-Carbobenzoxy-glycyl-L-tyrosyl-triglycyl-L-tyrosyl-glycyl-glycin wurden, wie beim Triglycyl--L-tyrosyl-glycyl-L-tyrosyl-glycyl-glycin beschrieben, mit 2 g $PdO/BaSO_4$-Katalysator hydriert. Die wie üblich isolierte Verbindung wurde mehrmals unter Zusatz von Aktivkohle aus Wasser umkristallisiert. Sie enthielt nach dem Trocknen noch 1 Mol Wasser.

Ausbeute: 1,1 g = 65 % ; R_F = 0,38 (Lösungsmittel A)
Schmp.: 180-185° (Z) ; $[\alpha]_D^{20}$ = 18,6° (c = 0,5 in Wasser)

$C_{30}H_{38}N_8O_{11}\cdot H_2O$ (704,71)

Ber.:	C	51,13	H	5,72	N 15,90
Gef.:	C	51,00	H	5,76	N 15,72

Versuch zur Herstellung von cyclo-(Triglycyl-L-tyrosyl--glycyl-L-tyrosyl-diglycyl-)

820 mg (0,001 Mol) N-Carbobenzoxy-triglycyl-L-tyrosyl-glycyl-L-tyrosyl-glycyl-glycin wurden in 12 ccm Dimethylformamid gelöst, mit 0,5 ccm absolutem Pyridin und 500 mg (0,0015 Mol) Di-p-nitrophenyl-sulfit versetzt. Die Lösung wurde 2 Stunden auf 50° erwärmt und dann eingedampft. Der Rückstand wurde nach Verreiben mit Äther fest und wurde mehrmals gründlich mit Äther gewaschen. Das trockene feste Reaktionsprodukt wurde mit Wasser aufgeschlämmt, gründlich verrieben, abgesaugt und vorsichtig mit 0,5 n HCl, Wasser und Äther gewaschen. Der getrocknete Rückstand (550 mg) wurde ohne Reinigung weiterverarbeitet.

550 mg (0,00058 Mol) N-Carbobenzoxy-triglycyl-L-tyrosyl--glycyl-L-tyrosyl-glycyl-glycin-p-nitrophenylester wurden mit 2 ccm Eisessig und 0,6 ccm 37-proz. HBr/Eisessig versetzt. Der entstandene Brei wurde unter ständigem Verreiben unter Wasserausschluß 1 Stunde reagieren gelassen. Dann wurde mit etwa 10 ccm absolutem Äther verdünnt, abgesaugt, gründlich mit Äther gewaschen und getrocknet. Es wurden 510 mg Rohprodukt erhalten. Das rohe p-Nitrophenylester-Hydrobromid wurde in etwa 7 ccm Dimethylformamid gelöst, die Lösung filtriert, mit 0,5 ccm Eisessig versetzt und im Laufe von 8 Stunden in etwa 80 ccm absolutes Pyridin bei 50° unter Rühren eintropfen gelassen. Der ölige Rückstand wurde mehrmals mit Äther und Essigester ausgekocht und getrocknet. Rohprodukt:350 mg. Die Substanz zeigte im Chromatogramm etwa 5 bis 6 gegenüber diazotierter Sulfanilsäure aktive Fraktionen. Alle Fraktionen waren, wenn auch in unterschiedlicher Stärke, gegenüber der Reaktion mit Pauli'schem Reagens, ninhydrinaktiv. Weder durch Umfällen noch durch Säulenchromatographie an Cellulosepulver ließ sich eine reine ninhydrinnegative Fraktion isolieren.

Der gleiche Versuch wurde unter geänderten Bedingungen mehrmals wiederholt: N-Carbobenzoxy-triglycyl-L-tyrosyl-triglycyl-L-tyrosin an Stelle von N-Carbobenzoxy-triglycyl--L-tyrosyl-glycyl-L-tyrosyl-glycyl-glycin; Herstellung des p-Nitrophenylesters bei 60°; Cyclisierung bei 60°; Verwendung von selbst hergestellter absolut wasserfreier HBr/Eisessiglösung zur Abspaltung der Schutzgruppe.

In jedem Falle wurde ein Reaktionsgemisch erhalten, das - wie die Ninhydrinreaktion des Chromatogramms zeigte - zum größten Teil aus linearen Komponenten bestand. Eine Isolierung einzelner ninhydrinnegativer Fraktionen gelang in keinem Fall.

B. Tabellenanhang

Im Folgenden sind die modifizierten molaren Rotationen

$$[m'] = \frac{3}{n^2+2} \cdot \frac{[\alpha[M}{100}$$

der Verbindungen I bis VI in Abhängigkeit von der Wellenlänge in Wasser, Dimethylsulfoxid und Dichloressigsäure, gemessen bei c = 0,5, tabelliert. Für M und $\frac{3}{n^2+2}$ wurden die folgenden Werte eingesetzt:

	$\frac{3}{n^2+2}$			M	
λ	H_2O	Me_2SO [1]	DCA [2]		
313	0,782	0,694	0,707	I	361,4
364	0,787	0,703	0,713	II	352,4
436	0,791	0,710	0,719	III	361,4
546	0,794	0,714	0,720	IV	359,4
578	0,795	0,718	0,722	V	352,4
				VI	361,4

1) Me_2SO = Dimethylsulfoxid

2) DCA = Dichloressigsäure

λ	I			II			III		
	H_2O [3]	Me_2SO	DCA	H_2O	Me_2SO	DCA	H_2O	Me_2SO	DCA
313	784	433,9	485,5	487,0	-539,3	201,1	147,5	-257,6	155,1
364	498,5	348,1	445,8	276,0	-393,9	188,7	67,8	-189,3	153,3
436	277,5	191,9	236,7	157,5	-240,7	108,2	30,3	-117,5	87,8
546	147,5	100,9	113,7	86,1	-137,1	61,9	12,0	- 67,3	48,1
578	127,0	87,2	98,1	74,7	-119,9	55,0	10,6	- 58,9	42,5

3) c = 1

	IV			V			VI		
313	565,0	144,9	308,2	314,5			370,0	-96,1	202,4
364	330,0	125,8	302,1	191,0	-16,6	209,8	213,0	-85,1	192,2
436	185,5	62,8	170,5	105,0	-18,3	118,3	118,5	-59,8	112,5
546	99,1	30,3	91,1	55,4	-13,6	61,9	62,5	-36,4	61,7
578	85,0	26,6	80,4	49,0	-11,6	52,4	54,3	-31,9	54,8

	$\frac{I + III}{2}$		$\frac{II + III}{2}$		VI - II	IV - $\frac{I+III}{2}$		V - $\frac{II+III}{2}$	
	Me_2SO	DCA	Me_2SO	DCA	DCA	Me_2SO	Me_2SO	DCA	Me_2SO	DCA
313	88,2	320,3	-398,5	178,1	+1,3	443,2	56,7	-12,1	-	-
364	79,4	299,6	-291,6	171,0	+3,5	308,8	46,4	+ 2,5	275,0	38,8
436	37,2	162,3	-179,1	98,0	+4,3	187,9	25,6	+ 8,2	160,8	20,3
546	16,8	80,9	-102,2	55,0	-0,2	100,7	13,5	+10,2	88,6	6,9
578	14,2	70,3	- 89,4	48,8	-0,2	88,0	12,4	+10,1	77,8	3,6

Die folgenden Tabellen enthalten die spezifischen Drehwinkel [α] der Verbindungen I bis VI bei den angegebenen pH-Werten

I

pH	6,06	6,97	7,72	8,45	9,39	9,82	10,07	12,59
313	310,0	302,0	304,0	236,0	190,0	199,0	210,0	233,0
364	170,5	167,0	172,5	168,5	180,0	191,0	200,0	224,0
436	95,3	93,7	96,6	93,6	98,6	104,0	108,2	118,0
546	51,1	50,2	51,3	49,5	51,4	54,8	56,5	60,8
578	44,9	43,5	44,5	42,9	44,0	47,5	48,8	52,5

II

pH	5,07	6,08	7,06	7,80	8,58	9,44	9,85	10,15	12,53
313	154,8	152,7	137,0	110,5	73,7	73,5	81,9	94,2	111,6
364	86,6	85,7	83,2	80,4	67,0	71,1	80,2	91,4	108,8
436	49,1	48,8	48,5	45,6	37,8	39,3	43,5	49,1	58,4
546	26,4	26,3	26,6,	24,7	20,0	21,0	22,9	25,8	29,0
578	22,9	22,7	23,0	21,3	17,6	18,8	19,8	22,3	25,0

III

pH	6,05	7,00	7,77	8,54	9,46	9,94	10,15
313	56,4	58,0	68,1	68,0	60,4	72,6	81,8
364	26,0	26,2	33,5	38,8	52,5	64,8	72,2
436	12,2	11,5	16,6	19,0	24,1	31,1	34,7
546	5,5	5,2	8,3	8,9	10,7	15,0	16,3
578	4,9	4,3	7,7	7,9	9,4	12,8	13,8

IV

pH	1,42	2,34	3,26	4,13	5,12	6,12	7,06
313	153,7	154,7	169,0	197,2	200,0	201,3	192,0
364	81,8	82,9	93,2	111,3	113,1	114,0	112,8
436	44,1	44,4	53,0	62,0	62,9	63,2	62,5
546	22,8	22,9	26,1	33,0	33,5	33,5	33,4
578	19,6	19,7	22,6	28,6	29,0	28,7	28,7

pH	7,91	8,77	9,61	10,05	10,31	12,66
313	179,7	126,7	128,9	141,1	148,6	168,5
364	115,3	114,1	126,7	138,5	145,7	166,0
436	63,0	63,2	68,0	75,0	78,1	87,9
546	33,1	33,5	36,1	39,4	40,4	45,1
578	28,4	29,1	30,9	34,5	34,8	39,0

V

pH	6,08	7,04	7,94	8,83	9,73	10,23	10,77
313	58,4	57,6	57,5	45,8	50,0	56,1	64,5
364	32,6	31,9	33,3	37,6	47,4	54,9	63,5
436	18,0	17,6	18,6	21,0	25,6	29,2	34,0
546	9,3	8,9	9,6	11,0	13,6	15,1	17,7
578	7,8	7,5	7,6	9,4	11,8	13,0	15,4

VI 4)

pH	5,08	6,07	7,04	7,92	8,81	9,53	9,82	10,20	12,59
313	116,0	119,3	114,2	105,7	66,5	73,2	80,0	88,0	99,8
364	62,9	66,4	64,2	60,9	57,7	69,0	76,5	84,0	98,5
436	35,2	37,1	35,4	33,1	32,0	37,9	41,4	45,1	52,7
546	18,7	20,7	19,0	17,2	16,9	20,2	21,8	23,6	27,3
578	16,4	19,0	17,5	14,6	15,4	17,7	18,8	20,5	23,9

4) bei pH 5,08 bis 8,81 c = 0,25

Z-gly-gly-gly-tyr-OH		Z-gly-tyr-gly-gly-gly-tyr--gly-gly-OH	
pH	7,47	9,51	7,63	9,54
313	228,2	148,9	70,1	55,5
364	122,5	133,5	39,6	53,8
436	68,0	73,5	21,3	28,8
546	36,3	39,0	11,0	15,0
578	31,7	34,0	9,7	13,3

Die Lösungen wurden in Fixanalpuffern der Firma Merck hergestellt. Die Konzentration war, wenn nicht anders angegeben, 0,5 g je 100 ccm. Die pH-Werte wurden mit einer Glaselektrode der Firma Metrohm, Herisau, und einem pH-Meßgerät der Firma Knick gemessen.

Auswertung von Rotationsdispersionen mit Hilfe der Moffit'schen Gleichung

Die λ_o-Werte wurden bestimmt, indem $[m'] \frac{\lambda^2 - \lambda_o^2}{\lambda_o^2}$ gegen $\frac{\lambda_o^2}{\lambda^2 - \lambda_o^2}$ für verschiedene λ_o aufgetragen wurde, bis eine Gerade erhalten wurde. Die Neigung der Geraden gibt

den Parameter b_o und ihr Ordinatenschnittpunkt a_o an.

	II - DCA; λ_o = 275 nm			II - Me_2SO; λ_o = 260 nm		
λ	[m']	$\frac{\lambda_o^2}{\lambda^2 - \lambda_o^2}$	$[m']\frac{\lambda^2 - \lambda_o^2}{\lambda_o^2}$	[m']	$\frac{\lambda_o^2}{\lambda^2 - \lambda_o^2}$	$[m']\frac{\lambda^2 - \lambda_o^2}{\lambda_o^2}$
313	201,1	3,384	59,4	-539,3	2,226	242,3
364	188,7	1,330	141,9	-393,9	1,042	378,1
436	108,2	0,661	163,8	-240,7	0,552	436,2
546	61,9	0,340	182,1	-137,1	0,293	467,5
578	55,0	0,293	188,0	-119,9	0,254	472,7

	VI - DCA; λ_o = 275 nm			VI - Me_2SO; λ_o = 230 nm		
λ	[m']	$\frac{\lambda_o^2}{\lambda^2 - \lambda_o^2}$	$[m']\frac{\lambda^2 - \lambda_o^2}{\lambda_o^2}$	[m']	$\frac{\lambda_o^2}{\lambda^2 - \lambda_o^2}$	$[m']\frac{\lambda^2 - \lambda_o^2}{\lambda_o^2}$
313	202,4	3,384	59,8	-96,1	1,174	81,9
364	192,2	1,330	144,5	-85,1	0,665	128,0
436	112,5	0,661	170,3	-59,8	0,386	155,1
546	61,7	0,340	181,5	-36,4	0,216	168,7
578	54,8	0,293	187,3	-31,9	0,188	169,6

Als weitere Werte wurden ermittelt:

IV - DCA : λ_o = 283 nm

IV - Me_2SO : $\lambda_o \approx$ 300 nm

II - pH 6,08 : λ_o = 270 nm

II - pH 12,53 : $\lambda_o >$ 290 nm

Zusammenfassung

Die Synthese der Peptide

Gly-gly-gly-L-tyr

Gly-L-tyr-gly-gly

Gly-gly-L-tyr-gly

Gly-gly-gly-L-tyr-gly-gly-gly-L-tyr

Gly-gly-gly-L-tyr-gly-L-tyr-gly-gly

Gly-L-tyr-gly-gly-gly-L-tyr-gly-gly

wird beschrieben.

Die Rotationsdispersionen der Verbindungen in Dimethylsulfoxid und Dichloressigsäure sowie in Wasser bei verschiedenen pH-Werten wurden bestimmt.

Durch Vergleich der Dispersionen von Octapeptiden und Tetrapeptiden in Dimethylsulfoxid und Dichloressigsäure wurde ein wahrscheinlich strukturbedingter Drehungsbeitrag für alle Octapeptide in Dimethylsulfoxid gefunden. Die Richtung dieser Drehungsänderung steht im Einklang mit derjenigen, die beim Uebergang von Polypeptiden in rechtsgewendelte α-Helixstrukturen auftritt.

Die Cyclisierung der Octapeptide über die p-Nitrophenylester gelang nicht. Es wird angenommen, daß durch die Konstellation der linearen Peptide in Lösung eine intramolekulare Umsetzung gehemmt wird.

Literaturverzeichnis

1) L.Pauling, R.B.Corey und H.R.Branson, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 37,205 (1951)

2) C.H.Bamford, L.Brown, A.Elliott, W.E.Hanby und I.F.Trotter, Nature 169, 357 (1952) Proc. Roy. Soc., London, B 141, 49

3) J.Applequist und P.Doty in Stahmann, "Polyamino Acids, Polypeptides and Proteins", Intern. Symp., Univ. Wisconsin 1961, S.161

G.R.Bird, E.R.Blout, J.Amer.Chem.Soc., 81, 2499 (1959)

P.Doty, A.Wada, J.T.Yang und E.R.Blout, J.Polymer Science 23, 851 (1957)

4) W.Lautsch und Mitarbb., Kolloid-Z. 138, 129 (1954) 144, 82 (1955)

5) R.Shingte, Dissertation FU Berlin, 1960

6) H.Rauhut, Dissertation FU Berlin, 1960

7) D.Heinicke, Dissertation FU Berlin, 1960

8) G.Schreiber, Dissertation FU Berlin, 1962

9) W.Grimm, Dissertation FU Berlin, 1964

10) E.Bödefeld, Dissertation FU Berlin, 1965

11) H.J.Kraege, Dissertation FU Berlin, 1957

12) D.Günther, Dissertation FU Berlin, 1958

13) G.Schulz, Dissertation FU Berlin, 1958

14) W.Bandel, Dissertation FU Berlin, 1960

15) M.Bergmann, L.Zervas, Ber.Dtsch.Chem.Ges. 65, 1192 (1932)

16) R.Schwyzer, B.Iselin, M.Feurer, Helv.Chim.Acta 38, 69 (1955)

17) M.Bergmann, L.Zervas, Ber.Dtsch.Chem.Ges. 65, 1201 (1932)

18) D.Ben Ishai, J.Org.Chemistry, 17, 1564 (1952)

19) E.R.Blout und R.H.Karlson, J.Amer.Chem.Soc., 80, 1259 (1958) vgl. Advances in Protein Chemistry 1961, 451

20) P.Drude "Lehrbuch der Optik", 2. Auflage, S.Hirzel Verlag, Leipzig, 1906

21) W.Moffit, J.T.Yang, Proc.Natl.Acad.Sci., USA 42, 596 (1956)

22) P.Doty, R.D.Lundberg, Prov.Natl.Acad.Sci.,USA, 43, 213 (1957)

23) R.Blout, P.Doty und J.T.Yang, J.Amer.Chem.Soc., 79, 749 (1957)

24) A.R.Downie, A.Elliott, W.E.Hanby und B.R.Maleden, Proc.Roy.Soc., London A 242, 325 (1957)

25) D.D.Fitts, J.G.Kirkwood, Proc.Natl.Acad.Sci., USA 42, 33 (1956) 43, 1046 (1957)
J.Amer.Chem.Soc., 78, 2650 (1956)

26) M.Goodman und E.Schmitt, J.Amer.Chem.Soc., 81, 5507 (1959)

27) L.Tschugaeff, Ber.Dtsch.Chem.Ges. 31, 360 (1898)
W.Kuhn, 'Theorie und Grundgesetze der optischen Aktivität' in 'Stereochemie' von K.Freudenberg, Leipzig, 1933, S. 317-432.

28) C.Djerassi, 'Optical Rotatory Dispersion', 1.Aufl.(1960) Mc Graw-Hill, New York, S. 244

29) W.F.Harrington und J.A.Schellman, Comt.rend.trav.lab. Carlsberg, Ser.chim., 30, 21 (1956)

30) P.Doty, A.Wada, J.T.Yang und E.R.Blout, J.Polymer Science, 23, 851 (1957)

31) R.Schwyzer, B.Iselin, W.Rittel und P.Sieber, Helv.Chim. Acta, 39, 872 (1956)

32) J.D.Coombes, E.Katchalski und P.Doty, Nature, 185, 534

33) S.Goldschmidt, H.Lautenschläger, Liebigs Ann.Chem. 580, 68 (1953)

34) N.Izumiya und H.Uchio, J.Biochem.,Tokyo, 46, 235 (1959)

35) R.Kuhn und H.J.Haas, Angew.Chemie, 67, 785 (1955)

36) W.Kamm, Diplomarbeit FU Berlin, 1957

37) T.Yamashita, J.Biochem., Tokyo, 48, 651 (1960)

38) W.Kamm, Dissertation FU Berlin, 1964

39) E.Fischer und E.Fourneau, Ber.Dtsch.Chem.Ges. 34, 2872 (1901)

Die vorliegende Arbeit wurde im Institut für Organische Chemie der Freien Universität Berlin angefertigt.

Meinem verstorbenen Lehrer, Herrn Professor Dr. W. Lautsch, schulde ich für die Uberlassung des Themas der Arbeit, die Bereitstellung der Mittel und die erhaltenen Anregungen Dank.

Herrn Professor Dr.W. Broser danke ich für die Uebernahme der Arbeit und die mir jederzeit gewährte hilfreiche Unterstützung.

Lebenslauf

Am 8. Dezember 1929 wurde ich in Quedlinburg als Sohn des Volksschullehrers Otto Neubauer und seiner Ehefrau Katharine geb. Peyer geboren.

Ich besuchte in Quedlinburg die Grundschule und von 1940 bis 1948 die Oberschule. Die Reifeprüfung legte ich im Juli 1948 ab und arbeitete von November 1948 bis Mai 1949 im chemischen Laboratorium eines Pflanzenzüchtungsinstitutes.

Im Sommersemester 1949 begann ich, an der Freien Universität Berlin Chemie zu studieren. 1952 legte ich die Diplom-Vorprüfung und 1957 nach Anfertigung meiner Diplomarbeit unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. W.Lautsch die Diplom-Hauptprüfung ab.

Anschließend begann ich mit der Anfertigung der Dissertation bei Herrn Prof. Dr. W. Lautsch.